

# **DAS HOCHAFFINE GLUCOSE-TRANSPORT-SYSTEM VON NEUROSPORA CRASSA**

**Versuche zum Mechanismus seiner Regulation und Energetik  
sowie zur Markierung und Isolierung  
seiner dereprimierbaren Komponente**

**Johann M. Brass**

---

1976







DAS HOCHAFFINE GLUCOSE-TRANSPORT-SYSTEM

VON NEUROSPORA CRASSA

Versuche zum Mechanismus seiner Regulation  
und Energetik sowie zur Markierung und  
Isolierung seiner dereprimierbaren Komponente

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Johann M. Brass

aus Lindau

München 1976

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
Januar 1971 bis Juli 1976 am Genetischen  
Institut der Universität München unter der An-  
leitung von Herrn Professor Dr. W. Klingmüller  
durchgeführt.



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Klingmüller

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1976

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

|          |   |                                                            |
|----------|---|------------------------------------------------------------|
| glc      | = | D-Glucose                                                  |
| 3-O-mglc | = | 3-O-Methyl-D-Glucose                                       |
| db-c-AMP | = | N <sup>6</sup> -2'-O-Dibutyryl-Adenosin 3':5'-Monophosphat |
| GC       | = | Glycerol Complete Medium                                   |
| FCP      | = | Fries-Citrat-Puffer                                        |
| CHX      | = | Cycloheximid                                               |
| S 2000   | = | Supernatant nach 2000 g Zentrifugation,<br>siehe Tabelle 6 |
| P 2000   | = | Pellet nach 2000 g Zentrifugation,<br>siehe Tabelle 6      |
| rpm      | = | revolutions per minute                                     |
| cpm      | = | counts per minute                                          |
| dpm      | = | disintegrations per minute                                 |
| SDH      | = | Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreductase                        |
| Tris     | = | Trishydroxymethylaminomethan                               |
| GTS I    | = | Glucose-Transport-System I<br>(niederaffin, konstitutiv)   |
| GTS II   | = | Glucose-Transport-System II<br>(hochaffin, dereprimierbar) |
| PTS      | = | Phospho-Transferase-System                                 |
| FCCP     | = | Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon            |
| DCCD     | = | Dicyclohexylcarbodiimid                                    |
| PPO      | = | 2,5-Diphenyloxazol                                         |
| POPOP    | = | 2,2' Phenylen-bis (5-phenyloxazol)                         |



# Inhaltsverzeichnis

|     |                                                                                                                                     |        |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A.  | Einleitung .....                                                                                                                    | 1 - 6  |
| B.  | Material und Methoden .....                                                                                                         | 7 - 34 |
| 1   | Stämme .....                                                                                                                        | 7      |
| 2   | Medien und Puffer .....                                                                                                             | 7      |
| 3   | Besondere Chemikalien und Filter .....                                                                                              | 9      |
| 4   | Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien .....                                                                                   | 10     |
| 5   | Herstellen von Konidiensuspensionen .....                                                                                           | 10     |
| 6   | Plattierung von Konidien Sorbose-resistenter<br>Mutanten, Sorbose-Resistenz-Test .....                                              | 10     |
| 7   | Messung der $^{14}\text{C}$ -3-O-Methyl-D-Glucose-Aufnahme<br>angekeimter Konidien .....                                            | 10     |
| 7.1 | Ankeimung der Konidien mit Glucose .....                                                                                            | 10     |
| 7.2 | Aushungerung der angekeimten Konidien in FCP .....                                                                                  | 11     |
| 7.3 | Inkubation der angekeimten Zellen in $^{14}\text{C}$ -3-O-Methyl-<br>D-Glucose .....                                                | 11     |
| 7.4 | Bestimmung der Glucose-Transportrate von in<br>Cycloheximid ausgehungerten Zellen .....                                             | 12     |
| 7.5 | Bestimmung der Glucose-efflux-Rate aus angekeimten,<br>vorbeladenen Zellen .....                                                    | 12     |
| 7.6 | Messung des $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Gegentransportes ange-<br>keimter und mit $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc vorbeladener Zellen ..... | 13     |
| 7.7 | Messung der $\text{pH}$ -Veränderung im Inkubationsgemisch<br>nach Zugabe von 3-O-mglc zu angekeimten Konidien .....                | 13     |
| 8   | Versuche zur preferentiellen Markierung des GTS II<br>durch radioaktives Leucin während seiner Neusynthese ..                       | 14     |
| 9   | Gewinnung spezieller Zellfraktionen aus angekeimten<br>Konidien bzw. Mycel von Neurospora .....                                     | 17     |
| 9.1 | Osmotischer Schock .....                                                                                                            | 17     |

|      |                                                                                                                |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.2  | Differentielle Zentrifugation aufgeschlossener Mycelien zur Isolierung von Plasmamembranen .....               | 17 |
| 9.3  | Gleichgewichts-Zentrifugation von Membranvesikeln des P 150 000 im Sucrosegradienten .....                     | 18 |
| 10   | Bestimmung der Aktivität von mitochondrialen und Zellmembran-Leitenzymen in verschiedenen Zellfraktionen ..... | 19 |
| 10.1 | Messung der Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (EC 1.3.99.1.) .....                                           | 19 |
| 10.2 | Messung der $Mg^{2+}$ -ATPase (EC 3.6.1.3.) .....                                                              | 20 |
| 11   | Herstellung elektronenoptischer Bilder von Dünnschnitten der Membranvesikel des P 150 000 .....                | 25 |
| 12   | Versuche zur Messung der Bindeaffinität von Neurospora-Zellmembranen für Glucose .....                         | 25 |
| 12.1 | Gleichgewichtsdialyse .....                                                                                    | 25 |
| 12.2 | Silicon-Filtrations-Zentrifugation .....                                                                       | 26 |
| 13   | Auftrennung der Proteine verschiedener Zellfraktionen in der SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese .....        | 29 |
| 13.1 | Herstellung der Gele .....                                                                                     | 29 |
| 13.2 | Färbung der Proteinbanden in den Gelen .....                                                                   | 30 |
| 13.3 | Aufbereitung der Proben für die Radioaktivitätsmessung .....                                                   | 30 |
| 13.4 | Automatische Quenchkorrektur .....                                                                             | 31 |
| 14   | Vergleich des Sauerstoffverbrauches von Glucose- und Glycerin-angekeimten bzw. ausgehungerten Konidien .....   | 32 |
| 15   | Statistische Sicherung der Meßdaten .....                                                                      | 33 |
| 15.1 | Mutungsgrenzen .....                                                                                           | 33 |
| 15.2 | Regressionsanalyse .....                                                                                       | 33 |
| 15.3 | t-Test .....                                                                                                   | 34 |

|     |                                                                                                                                                       |          |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| C.  | Ergebnisse .....                                                                                                                                      | 35 - 119 |
|     | Teil I                                                                                                                                                |          |
|     | Versuche zur Regulation und zur Energetik des<br>GTS II .....                                                                                         | 35       |
| 1   | Messung der 3-O-Methyl-D-Glucose-Aufnahme zur Be-<br>stimmung der GTS II-Aktivität von Neurospora .....                                               | 35       |
| 2   | Zeitmuster der Aktivitätsveränderungen des GTS II<br>während der Ankeimung von Neurosporangien nach<br>Aushungerung bzw. Glycerinweiterkeimung .....  | 39       |
| 3   | Wirkung einer Aushungerung Glucose-angekeimter<br>Zellen auf die Affinität ( $K_m$ ) und die maximale<br>Transportrate ( $V_{max}$ ) des GTS II ..... | 45       |
| 4   | Versuche zur Hemmung der Aushungerungs-bedingten<br>Steigerung der GTS II-Aktivität durch Translations-<br>und Transkriptionsgifte .....              | 47       |
| 4.1 | Hemmung der Proteinsynthese von angekeimten Zellen<br>während der Aushungerung .....                                                                  | 48       |
| 4.2 | Wirkung einer Rifampicin-Inkubation aushungernder<br>Neurosporangien auf deren GTS II-Aktivität .....                                                 | 53       |
| 5   | Wirkung von c-AMP auf die Regulation des GTS II .....                                                                                                 | 56       |
| 6   | Versuche zur Aufklärung der Kopplung des aktiven<br>Glucosetransportes mit dem Energiestoffwechsel<br>der Neurospora-Zelle .....                      | 61       |
| 6.1 | GTS II-vermittelter Glucose-efflux und Glucose-<br>Gegentransport .....                                                                               | 62       |
| 6.2 | Die chemiosmotische Hypothese des Aktiven<br>Transportes .....                                                                                        | 71       |
| 7   | Messung des Glucose- und des Galactose-Transportes<br>verschiedener Sorbose-resistenter Mutanten von<br>Neurospora .....                              | 74       |

|                                              |                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Teil II                                      |                                                                                                                                             |
| Versuche zur Markierung und Isolierung der   |                                                                                                                                             |
| dereprimierbaren Komponente des GTS II ..... | 78                                                                                                                                          |
| 8                                            | Isolation von Plasmamembran-Vesikeln von Neurospora .. 78                                                                                   |
| 8.1                                          | Chemische Leitmerkmale von Plasmamembranen ..... 79                                                                                         |
| 8.2                                          | Zellaufschluß und Zellfraktionierung angekeimter<br>Neurosporzellen. Leitenzyme von Plasmamembranen ..... 79                                |
| 8.3                                          | Verteilung der Aktivitäten von mitochondrialen<br>und Zellmembran-Leitenzymen in verschiedenen Zell-<br>fraktionen ..... 81                 |
| 9                                            | Charakterisierung der Oligomycin-resistenten ATPase<br>durch ihre Membrangebundenheit; Ionenspezifität und<br>durch ihr pH-Optimum ..... 85 |
| 9.1                                          | Gleichgewichtszentrifugation von Membranvesikeln<br>des P 150 000 im Sucrosegradienten ..... 85                                             |
| 9.2                                          | Elektronenoptische Abbildungen von Membranvesikeln<br>der an Oligomycin-resistenter ATPase reichen<br>Region im Sucrosegradienten ..... 88  |
| 9.3                                          | Messung der Ionenabhängigkeit der Oligomycin-<br>resistenten $Mg^{2+}$ -ATPase ..... 90                                                     |
| 9.4                                          | Abhängigkeit der Oligomycin-resistenten $Mg^{2+}$ -ATPase-<br>Aktivität vom $p_H$ des Testgemisches ..... 93                                |
| 10                                           | Messung der Bindeaffinität der isolierten<br>Zellmembranvesikel für Glucose ..... 95                                                        |
| 10.1                                         | Gleichgewichtsdialyse von $^{14}C$ -3-O-mglc-inkubierten<br>Zellmembranvesikeln ..... 95                                                    |
| 10.2                                         | Silicon-Filtrations-Zentrifugation von $^{14}C$ -3-O-mglc-<br>inkubierten Zellmembranvesikeln ..... 99                                      |
| 11                                           | Isolierung peripherer Membranproteine durch<br>osmotischen Schock von angekeimten Konidien ..... 105                                        |
| 12                                           | Anwendung der differentiellen Isotopen-Doppel-<br>markierung zur Identifizierung von dereprimier-<br>baren GTS II-Proteinen ..... 106       |

|    |                                                                                                     |           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 13 | Analyse der differentiell doppelmarkierten<br>Zellfraktion der löslichen Proteine (S 150 000) ..... | 108       |
| 14 | Analyse differentiell doppelmarkierter<br>Proteine des P 150 000 .....                              | 111       |
| 15 | Analyse differentiell doppelmarkierter Schock-<br>proteine .....                                    | 113       |
| D. | Diskussion .....                                                                                    | 120 - 137 |
| E. | Zusammenfassung .....                                                                               | 138 - 139 |
|    | Literaturverzeichnis .....                                                                          | 140 - 151 |



## A. Einleitung

Die Plasmamembran von Mikroorganismen, die als Barriere zwischen der sich ständig ändernden Umwelt und dem Zellinneren steht, und die in dieser Membran integrierten spezifischen Transport-Systeme ermöglichen der Zelle die Kontrolle über die Konzentrationen der für die verschiedenen Lebensfunktionen notwendigen Metabolite und Ionen. Nur in selektiver Weise gelangen die für die Zelle nötigen Stoffe in das Zellinnere, entweder durch Carrier-katalysierte Diffusion oder durch Carrier-vermittelten Aktiven Transport gegen ein Konzentrationsgefälle.

Man glaubte lange Zeit, daß die Stoffaufnahme durch Poren in der Zellmembran bedingt sei und daß die Permeation der passierenden Moleküle von deren Größe oder Lipidlöslichkeit abhängig wäre. Die beobachtete Stereospezifität und Sättigungskinetik sowie die oft nachgewiesene Induzierbarkeit der Stoffaufnahme widerlegten diese Anschauung.

Nicht nur im Kontakt mit dem Außenmedium der Zelle steuern jedoch Transport-Systeme die Stoffwechselwege, sondern auch im Zellinneren vermitteln sie zwischen den durch Lipoproteinemembranen streng abgeschirmten Kompartimenten. Für Mitochondrien sind spezifische Nucleotid- und Ionen-Transport-Systeme (Klingenberg, M. et al, 1974 und Racker, E., 1970) und für die Chloroplasten Carbonsäure-Carrier beschrieben worden (Heldt, H. W.; Sauer, F., 1971).

Auch für die Ausschleusung von messenger - RNS durch die Kernmembran wird neben einfacher Diffusion durch Membran-Poren ein Carrier-vermittelter aktiver Transport der m-RNS durch die Kernmembran von einigen Autoren erwogen (Franke, W. W., pers. Mitteilung).

Beispiele für spezifische, nach dem Außenmedium hin orientierte Transport-Systeme liefert der genetisch und biochemisch sehr gut untersuchte Schimmelpilz *Neurospora crassa*. Die Permeation der wichtigen Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose durch die

Zellmembran wird hier von zwei aktiven Transport-Systemen ermöglicht. *Neurospora*-Zellen besitzen ein Glucose-Transport-System I mit geringer Affinität für Glucose (GTS I,  $K_m = 23 \text{ mM}$ ) und das hochaffine Glucose-Transport-System II (GTS II,  $K_m = 30 \text{ } \mu\text{M}$ ), das der Zelle das Überleben auch bei sehr geringer Glucose-Konzentration im Medium ermöglicht (Scarborough, G., 1970 a, b). Über das GTS II werden die Hexose-Zucker Glucose und Sorbose, nicht jedoch die verwandten Hexose-Zucker Fructose und Galactose in die Zelle eingeschleust. Diese Zucker werden über weitere, unabhängige Transportsysteme aktiv in die *Neurospora*-Zelle aufgenommen (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 a).

Die Glucose-Transport-Systeme I und II sind bei *Neurospora* im Gegensatz zu den Glucose-Transport-Systemen vieler Hefen, die offenbar genetisch an uneingeschränkte Zuckerzufuhr angepaßt sind, aktive Transport-Systeme. Sie können das Substrat Glucose auch gegen einen chemiosmotischen Gradienten transportieren. Nach spezifischer Hemmung des zellulären Energiestoffwechsels dagegen führen das GTS I und das GTS II nur mehr zum Glucose-Konzentrationsausgleich zwischen Innen- und Außenmedium.

In jüngster Zeit gelang es, bei *Neurospora crassa* den molekularen Mechanismus der Kopplung zwischen dem Aktiven Transport von Glucose, Tryptophan, Kalium und Phosphat und dem Energiestoffwechsel der Zelle aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, daß hier ähnlich wie bei Bakterien, Grünalgen und Säugergeweben das Membranpotential die nötige Energie für die Substratakkumulation liefert (Slayman, C. L. et al. 1973 und Slayman, C. L.; Slayman, C. W., 1974 und Lowendorf, H. et al. 1974). Das vorgeschlagene chemiosmotische Modell des Aktiven Transports (Mitchell, P., 1967), bei dem ein von außen nach innen gerichteter Protonengradient über protonierbare Carrier (Protonen-Symport) die Substratanreicherung im Zellinneren ermöglichen soll, scheint bei *Neurospora crassa* eine mehrfache Bestätigung zu erfahren.

Ein konstitutives Transportsystem, das unter stetigem Energieverbrauch Glucose akkumuliert, ist für die Zelle vom Energiehaushalt her unökonomisch. Wohl aus diesem Grunde unterliegt bei *Neurospora* speziell das hochaffine GTS II der Glucose-Repression. Beim Wechsel der Zellen von Glucose-haltigem in

Glucose-freies Medium ist nach zwei Stunden eine Steigerung der Transportrate um den Faktor 15 bis 20 zu beobachten.

Die Existenz spezifischer Transport-Systeme führte zu der Frage nach ihrer Struktur und Arbeitsweise. Zur Lösung dieser Frage sind neben den klassischen Transportversuchen mit ganzen Zellen, wie sie im Teil I der vorliegenden Arbeit zur Klärung des Mechanismus der Regulation und der Energetik des GTS II unternommen wurden, in den letzten Jahren auch Berichte über erfolgreiche Isolationsversuche von Transport-Systemen bzw. von Teilkomponenten veröffentlicht worden. So streben es viele am Metabolit-Transport interessierte Arbeitsgruppen an, zellfreie Systeme zum Studium der komplexen Transportmechanismen biologischer Membranen aufzubauen. Die Isolierung und Charakterisierung spezifischer Transportproteine aus Membranen und Periplasma von Mikroorganismen soll die Möglichkeit eröffnen, das Zusammenwirken einzelner Membranfunktionen näher studieren zu können. Als Vorbilder gelten hier zwei in ihrer Aufklärung bereits sehr ausgereifte bakterielle Transportsysteme. Es sind dies einmal das Phospho-Transferase-System (PTS), das bei Bakterien eine große Bedeutung im Zuckertransport besitzt (Rosemann, S., 1969), und zum anderen das vom  $\gamma$ -Gen des Lac-Operons codierte  $\beta$ -Galactosid-Transport-System von *Escherichia coli* (Kennedy, E. P., 1970).

Das PTS ermöglicht z. B. die Akkumulation von Lactose in *Staphylococcus aureus* unter Phosphorylierung des Substrates während der Passage durch die Plasmamembran (group translocation). Von Phosphoenolpyruvat wird energiereiches Phosphat sequenziell über drei beteiligte, selbst phosphorylierbare Transport-Proteine auf das Substrat, z. B. Lactose übertragen. Die Analyse dieses genetisch wie biochemisch gut untersuchten Transport-Systems ist heute bereits bis auf die Erforschung des aktiven Zentrums der gereinigten Proteinkomponenten fortgeschritten (Kundig, W.; et al. 1964 und Kundig, W.; Roseman, J. 1971).

Die Funktion des  $\beta$ -Galactosid-Transport-Systems kann bei *E. coli* in isolierten, von Cytoplasma freien Zellmembran-Vesikelpräparationen unter Variation der verschiedensten Parameter getestet werden (Kaback, H. R., 1972). Zugabe von z. B. D-Lactat zu

Membranvesikeln von im Lac-Operon induzierten E. coli-Zellen führt zu einer Stimulierung der Lactose-Aufnahme in die Vesikel über den sonst nur beobachteten Konzentrationsausgleich hinaus. Diese Stimulierung der Substrataufnahme in zellfreien Vesikelpräparationen gilt auch für andere Zucker wie Galactose und für die meisten Aminosäuren. (Barnes, E.M.; Kaback H.R. 1970).

Transportversuche mit isolierten Zellmembranvesikeln wurden auch bei Eukaryonten unternommen. Bei Hefe-Plasmamembranvesikeln war es kürzlich gelungen, mindestens den passiven Glucose-influx bzw. den efflux aus vorbeladenen Vesikeln in einen Carrier-vermittelten, durch Uranyl-Ionen hemmbaren Anteil und einen nichthemmbaren, durch Diffusion und Vesikelzerfall bedingten Anteil aufzutrennen (Wehrli, E. et al. 1975).

Bei Neurospora wurde versucht, Zellmembranvesikel zu isolieren, die noch in vitro Glucose-Akkumulation zeigen (Wiley, W. R., 1974 b). Diese, wie eigene im Teil II der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche, bei denen unter Anlehnung an die chemiosmotische Hypothese des Aktiven Transportes durch Anlegen eines pH-Gradienten vom Vesikelinneren zum Vesikelaußeren die Membranen zur Akkumulation von Glucose gebracht werden sollten, waren jedoch bisher aus verschiedenen, in der Diskussion erläuterten Gründen nicht erfolgreich.

Mit den durch osmotischen Schock von ganzen Neurosporazellen angegebenen Schockproteinen konnte im Gegensatz zu den Zellmembranvesikeln eine Glucose-affine Zellfraktion isoliert werden (Hack, A., 1974). Eine Auftrennung dieser Fraktion in einzelne für die Bindung verantwortliche Proteine und deren Zuordnung zum GTS II war hierbei jedoch nicht möglich. Zur Lösung dieser Fragen sollte im Teil II der vorliegenden Arbeit versucht werden, mit Hilfe der Methodik der differentiellen Doppelmarkierung Komponenten des dereprimierbaren GTS II mit radioaktiven Aminosäuren während ihrer Neusynthese zu markieren, um sie so der Isolierung zugänglich zu machen. Bei E. coli war mit dieser Technik die Isolierung einer Membran-gebundenen Komponente des  $\beta$ -Galactosid-Transport-Systems gelungen (Kolber, A. R.; Stein, W. D., 1967 und modifiziert Fox, C. F.; Kennedy, E. P., 1965). Im Lac-Operon induzierte, mit  $^3\text{H}$ -Aminosäuren gezogene

Zellen besaßen ein  $^3\text{H}$ -markiertes Membran- (= M-) Protein, das in Zellen einer nichtinduzierten,  $^{14}\text{C}$ -markierten Kulturhälfte fehlte. Dieses M-Protein konnte nur aus Wildtyp-Zellextrakten isoliert werden, nicht jedoch aus Zellextrakten von Stämmen, die im  $\beta$ -Galactosid-Transportsystem mutiert sind.

In entsprechenden Experimenten wurden von uns bei *Neurospora crassa* einmal nach Zellaufschluß differentiell doppelmarkierte Plasmamembran-Vesikel präpariert. Als weitere Zellfraktion wurden zum anderen doppelmarkierte Proteine gewonnen, die nach osmotischem Schock von ganzen angekeimten *Neurospora*-Zellen abgegeben wurden. Nach Auftrennung der Membranproteine beider Zellfraktionen wurde nach Komponenten gesucht, die wie das GTS II in vivo sowohl durch Aushungerung als auch durch Glycerin-Fütterung in angekeimten *Neurospora*-Zellen dereprimiert und selektiv mit radioaktiven Aminosäuren markiert werden konnten. In der Fraktion der Schockproteine wurde von uns ein Protein gefunden, das durch diese Bedingungen dereprimierbar war.

Eine Abklärung der Frage, ob das dereprimierbare Schockprotein eine Komponente des GTS II darstellt, müßte durch eine vergleichende Analyse von GTS II - Defektmutanten versucht werden. Als solche GTS II - spezifische Mutanten wurden bisher Resistenzmutanten angesehen, die gegen den für *Neurospora* toxischen Zucker Sorbose selektiert worden waren. Diese  $\text{sor}^r$ -Mutanten, die durch Kreuzung und Komplementationstests sechs Genorten zugeordnet werden konnten (Klingmüller, W., 1967 b und c), weisen zum Teil einen gegenüber dem Wildtyp verringerten Sorbose- und Glucose-Transport auf.

Eingehendere Untersuchungen der in der GTS II-Aktivität am stärksten verminderten Mutante zeigten jedoch, daß dieser Stamm nicht nur in seiner GTS II-Aktivität, sondern auch in der Aktivität von anderen Transportsystemen wie zum Beispiel dem Galactose-Transport-System betroffen ist. Es scheint, als ob bei den  $\text{sor}^r$ -Mutanten kein spezifischer GTS II-Defekt vorliegt, sondern daß die pleiotropen Aktivitätsvermindierungen in verschiedenen Transportsystemen sekundär von den mehr oder weniger starken morphologischen Defekten dieser Stämme mitbedingt sind.

Die  $\text{sor}^r$ -Mutanten können also nicht zur Klärung der Frage herangezogen werden, ob mit der Isolierung des durch Aushungerung dereprimierbaren Schockproteins die dereprimierbare und Geschwindigkeits-bestimmende Komponente des GTS II gefunden ist. Hierzu wäre die Induktion neuer, auf einen spezifischen Defekt im GTS II hin selektierter Mutanten nötig. Dieses Vorhaben muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

## B. Material und Methoden

### 1 Stämme

*Neurospora crassa*, Wildtyp 74-OR-23-1A de Serres;

Herkunft: Dr. Mary E. Case, Yale University

sor<sup>r</sup>-Mutanten der Gene A, B und C, isoliert von Klingmüller nach Nitritbehandlung des Wildtyps; relativ unempfindlich gegen die toxische Wirkung der Sorbose; mit verringerter Sorbose-Aufnahme: sor<sup>r</sup> A 1; sor<sup>r</sup> A 3; sor<sup>r</sup> A 10; sor<sup>r</sup> B 57; sor<sup>r</sup> C 17; sor<sup>r</sup> 6 (Kopplungsgruppe und betroffenes Gen unbestimmt).

### 2 Medien und Puffer

Zur Ankeimung von Neurosporangazellen wurde Vogels-Minimal-Medium (nach Vogels, H. J., 1956) beziehungsweise Fries-Minimal-Medium (nach Beadle, G. W.; Tatum, E. L., 1941) verwandt. Zur Gewinnung von vegetativen Konidiosporen von *Neurospora* wurde Glycerol Complete Vollmedium folgender Zusammensetzung hergestellt:

|                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| 980 ml H <sub>2</sub> O     | 2,5 g Yeast Extrakt  |
| 20 ml Vogels Minimal 50fach | 1,0 g Casamino Acids |
| 10 ml Vitaminlösung         | 15,0 g Difco-Agar    |
| 10 ml Glycerin              |                      |

Zur Plattierung von Einzelkolonien wurde Glucose-Fructose-Sorbose-(GFS)-Medium folgender Zusammensetzung hergestellt:

Vogels Minimalmedium 50fach  
0,05 % Glucose  
0,05 % Fructose  
1,00 % Sorbose  
1,50 % Difco-Agar

Zum Sorbose-Test der Sorbose-resistenten Mutanten und zur Demonstration der Wachstumshemmung des Wildtyps durch Sorbose wurde folgendes Medium (Sorbose-Test-Agar) hergestellt:

980 ml  $H_2O$   
20 ml Vogels Minimalmedium 50fach  
10 ml Vitaminlösung  
1,5 % Difco-Agar  
0,025 % Sorbose

Für Glucose-Aufnahme-Versuche wurde Fries-Citrat-Puffer wie folgt hergestellt und mit Citronensäure auf pH 4,75 eingestellt.

|                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 2500 ml Fries-Minimalmedium | 2500 ml Citronensäure 0,1 M |
| 2500 ml $H_2O$              | 2500 ml $KH_2PO_4$ 0,2 M    |

Für den osmotischen Schock angekeimter Neurosporzellen wurden folgende Medien verwandt (nach Hack, A., 1974):

Hypertonisches Medium im Schritt A:

1,5 M Mannit, 1 mM Mercaptoäthanol, 0,1 M Tris.

Hypotonisches Medium im Schritt B:

$H_2O$ .

Der Zellaufschluß angekeimter Neurosporzellen erfolgte (nach Matile, Ph. et al., 1967) in folgendem Medium:

0,25 M Sucrose  
0,05 M Tris-HCL pH 7,2  
1,00 mM EDTA  
0,1 % BSA

### 3 Besondere Chemikalien und Filter

Von der Firma Serva, Heidelberg stammte:

Cycloheximid = Actidion (4 µg/ml) zur Hemmung der Protein-synthese bei Neurospora; Reagentien für die Diskelektrophorese,

Von der Firma Difco stammte:

Yeast Extract und Difco Bacto Agar;

Von der Firma Packard, Frankfurt stammte:

Reagentien für die Scintillationsspektrometrie:

PPO 5 g/Liter Toluol

POPOP 0,3 g/Liter Toluol und Soluene X-100 0,7 ml/ 10 ml  
Scintillator;

Von der Firma Amersham, England stammte:

3-O-Methyl-D-Glucose  $^{14}\text{C}$ -U spezifische Aktivität 10-25 mCi/mMol, CFB 141;

3-O-Methyl-D-Glucose  $^3\text{H}$  spezifische Aktivität 3,5 Ci/mMol, TRK 372;

L(4;5- $^3\text{H}$ )-Leucin spezifische Aktivität 1 Ci/mMol, TRA 170;

L(U -  $^{14}\text{C}$ )-Leucin spezifische Aktivität 348 mCi/mMol, CFB 67;

Von der Firma Boehringer, Mannheim stammte:

N<sup>6</sup>-2'O-Dibutyryl-Adenosin 3':5'-Monophosphat, cyclisches  
Mononatriumsalz;

Von der Firma Merck, Darmstadt stammten alle übrigen  
Chemikalien.

Von der Firma Sartorius, Göttingen stammte:

Cellulose-Nitrat-Membranfilter der Porengröße 0,2 µm  
(bakteriendicht) und 3 µm;

Von der Firma Amicon, Lexington, Mass. stammte:

Ultrafiltrationsmembranen Diaflo UM 10, Ausschußgrenze für  
Proteine mit Molekulargewicht  $\geq$  10 000 Daltons;

Von der Firma Schleicher/Schüll, München stammte:

Glasfaserfilter Nr. 9 Ø 21 mm;

#### 4 Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien

Erlenmeyer-Weithalskolben (300 ml, Schaumstoffkappenverschluß) mit je 50 ml Glycerol Complete (GC)-Vollmedium wurden mit Konidien inoculiert und bei 25 °C 7 Tage lang bebrütet (Standardkulturen).

#### 5 Herstellen von Konidiensuspensionen

Konidien 7 Tage alter Standardkulturen wurden als Staub trocken geerntet, in Fries-Citrat-Puffer (FCP) suspendiert und zur Entfernung von Mycel durch sterile Watte filtriert. Die Bestimmung des Konidientiters erfolgte im Hämocytometer oder im Coulter Counter. Es wurden jeweils zwei frische Füllungen ausgezählt. Die Suspension wurde auf  $4 \times 10^6$  Konidien/ml eingestellt.

#### 6 Plattierung von Konidien Sorbose-resistenter Mutanten, Sorbose-Resistenz-Test

$5 \times 10^2$  Konidien wurden in 100 ml geschmolzenem (47 °C) Sorbose-Test-Agar gegeben. Nach gutem Durchmischen wurde dieser in 5 Petrischalen gegossen. Innerhalb von 5 Tagen Bebrütung bei 25 °C bilden Zellen der Sorbose-resistenten Mutanten hierin große Kolonien (0,2 - 1 cm Ø), der Wildtyp dagegen nur eben sichtbare Kolonien (ca. 0,05 cm Ø).

#### 7 Messung der $^{14}\text{C}$ -3-O-Methyl-D-Glucose-Aufnahme angekeimter Konidien

##### 7.1 Ankeimung der Konidien mit Glucose

Zur Stimulierung des Stoffwechsels der 7 Tage alten Konidien wurde eine definierte Anzahl von Zellen auf ein steriles Membranfilter der Porengröße 3 µm niedergeschlagen, dreimal mit FCP gewaschen und anschließend in Flaschen mit FCP + 1 % Glucose

resuspendiert (Zelltiter  $4 \times 10^6$ /ml). Die Ankeimung der Zellen erfolgte unter Belüftung bei  $25^\circ\text{C}$  3 Stunden lang. Während dieser Zeit bilden die meisten Konidien ( $\varnothing$  ca.  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) Keimschläuche von  $5 - 15\text{ }\mu\text{m}$  Länge.

## 7.2 Aushungierung der angekeimten Konidien in FCP

Zur Derepression des Glucose-Transport-Systems wurden die angekeimten Zellen auf ein Membranfilter niedergeschlagen, dreimal mit FCP gewaschen und in Flaschen mit FCP resuspendiert, so daß der Zelltiter wiederum  $4 \times 10^6$ /ml betrug. Die Aushungierung erfolgte unter Belüftung bei  $25^\circ\text{C}$  120 Minuten lang.

## 7.3 Inkubation der angekeimten Zellen in $^{14}\text{C}$ -3-O-Methyl-D-Glucose

Zur Messung der Glucose-Aufnahmerate der nach B.7.1 und B.7.2 vorbehandelten Zellen wurden je  $1,2 \times 10^8$  Konidien auf Membranfilter abfiltriert, dreimal mit FCP gewaschen und in Flaschen mit 30 ml FCP +  $^{14}\text{C}$ -3-O-Methyl-D-Glucose ( $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc) ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ,  $1 \times 10^{-2}\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ) resuspendiert. Die Zellen wurden in Ultrathermostaten bei  $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$  unter Belüftung inkubiert. Zu vier verschiedenen Zeiten ( $1'/2,5'/4'/5,5'$ ) wurden jeweils 5 ml entnommen, über Glasfaserfilter filtriert und dreimal mit FCP gewaschen.

Die Filter wurden im Trockenschrank bei  $60^\circ\text{C}$  60 Minuten getrocknet. Die Radioaktivität der Proben, welche ein Maß für die Anzahl der in die Zellen aufgenommenen  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Moleküle ist, wurde nach Zusatz von 10 ml Scintillationsflüssigkeit in einem Packard Liquid Scintillation Spectrometer bestimmt. Die Transportrate der unterschiedlich vorbehandelten Zellen ergibt sich nach Auftragung der einzelnen Meßpunkte (cpm) aus der von Hand extrapolierten beziehungsweise, wo angegeben, durch Regressionsanalyse ermittelten Steigung der Kurve (cpm/min).

#### 7.4 Bestimmung der Glucose-Transportrate von in Cycloheximid ausgehungerten Zellen

Zur Entscheidung der Frage, ob die Regulation des GTS II durch feed-back-Hemmung auf Proteinebene oder aber durch Genrepression erfolgt, wurde die GTS II-Aktivität von Zellen bestimmt, die unter Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) ausgehungert worden waren.

Zwei identische Subkulturen von Konidien wurden nach B.7.1 angekeimt und danach von glc mit FCP freigesaschen. Beide Subkulturen wurden nun 30 Minuten (Transskriptionsphase) mit CHX ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert; die eine Subkultur wurde hierbei ausgehungert, die andere Subkultur wurde in 1 % glc weitergekeimt. Nach 30 Minuten wurde das CHX aus beiden Subkulturen ausgewaschen. Die Zellen beider Subkulturen wurden danach einheitlich in glc-haltigem Medium für weitere 120 Minuten (Translationsphase) inkubiert, währenddessen zu verschiedenen Zeitpunkten 30 ml Aliquote abgezweigt wurden zur Bestimmung der GTS II-Aktivität nach 7.3.

#### 7.5 Bestimmung der Glucose-efflux-Rate aus angekeimten, vorbeladenen Zellen

Zur Ermittlung der Glucose-efflux-Rate aus nach B.7.1 angekeimten Zellen wurden diese nach dem Waschen entweder gleich (Subkultur a) oder nach einer zweistündigen Aushungerung (Subkultur b) bis zu 60 Minuten lang in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc (Subkultur a:  $10^{-4} \text{ M}$ ,  $10^{-2} \mu\text{Ci/ml}$ , Subkultur b:  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-3} \mu\text{Ci/ml}$ ) vorbeladen. Die Substratvorbeladung beider Subkulturen wurde in CHX-haltigem Medium ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) vorgenommen, um im Falle der reprimierten Subkultur a eine De-repression des GTS II in dieser Zeit zu verhindern. Der Vorbeladungsgrad der Zellen beider Subkulturen wurde zu verschiedenen Zeiten durch Probenentnahme nach B.7.3 ermittelt. Nach unterschiedlichen Vorbeladungszeiten (5', 10' und 30') wurden Teile beider Subkulturen gewaschen und in  $\text{NaN}_3$ -haltigem FCP ( $10^{-2} \text{ M}$ , Subkulturen  $a_{1-3}$  und  $b_{1-3}$ ) bzw. in FCCP-haltigem FCP ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , Subkultur  $b_4$ ) resuspendiert. Der  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-efflux der so behandelten Zellen wurde durch Probenentnahme entsprechend B.7.3 nach verschiedenen Inkubationszeiten mit den Hemmstoffen ermittelt.

#### 7.6 Messung des $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic-Gegentransportes angekeimter und mit $^{12}\text{C}$ -3-O-mglic vorbeladener Zellen

Zur Ermittlung der efflux-bedingten Gegentransportrate von Glucose wurden nach B.7.1 angekeimte Zellen nach dem Waschen entweder gleich (Subkultur a, 30 ml) oder nach einer zweistündigen Aushungierung (Subkultur b, 60 ml) 60 Minuten lang mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglic ( $10^{-2}$  M) vorbeladen, beide Subkulturen hierbei wie in B.7.5 in CHX-haltigem Medium. Nach dem Waschen wurden die Zellen der Subkultur a in  $\text{NaN}_3$ -haltiges ( $10^{-2}$  M) und mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic versetztes Medium ( $10^{-4}$  M,  $10^{-2}$   $\mu\text{Ci/ml}$ ) überführt. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden entsprechend B.7.3 Proben entnommen.

Die Zellen der ausgehungerten und vorbeladenen Subkultur b wurden nach dem Waschen in zwei gleiche Subkulturen aufgeteilt und entweder in  $\text{NaN}_3$ -haltiges ( $10^{-2}$  M) oder in FCCP-haltiges ( $5 \times 10^{-6}$  M), jeweils mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic versetztes Medium überführt.

Als Kontrolle wurde weiter eine ausgehungerte, jedoch nicht vorbeladene Subkultur c in  $\text{NaN}_3$ -haltigem und mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic versetztem Medium inkubiert.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten der vier Subkulturen wurden entsprechend B.7.3 Proben entnommen und auf eine eventuelle Radioaktivitätsanreicherung in den Zellen (Gegentransport) hin untersucht.

#### 7.7 Messung der pH-Veränderung im Inkubationsgemisch nach Zugabe von 3-O-mglic zu angekeimten Konidien

Zur Prüfung der Frage, ob auch beim Glucose-Transport von Neurospora wie bei anderen Mikroorganismen ein Glucose-Protonen-Symport nachzuweisen ist, wurden die pH-Veränderungen im Inkubationsgemisch von angekeimten Zellen nach Zugabe von 3-O-mglic gemessen. Dazu wurden zwei Konidiensuspensionen (jeweils 200 ml, Titer =  $4 \times 10^6$  Zellen/ml) in Fries-Minimalmedium + 1 % Glucose 3 Stunden lang angekeimt.

Die eine Subkultur wurde daraufhin auf einem Filter von der Glucose freigewaschen, die Zellen in 10 ml destilliertem  $H_2O$  aufgenommen und danach der pH-Messung unterworfen. Die zweite Kultur wurde nach der dreistündigen Ankeimung ebenfalls von der Glucose freigewaschen, danach jedoch im Gegensatz zur ersten Kultur in 200 ml Fries-Minimalmedium aufgenommen, 60 Minuten ausgehungert, dann erst abfiltriert und in 10 ml destilliertem  $H_2O$  aufgenommen und der pH-Messung unterworfen.

Zur pH-Messung wurden 1 ml der ungepufferten Zellsuspension (Titer =  $8 \times 10^7$  Zellen/ml) in das Meßgefäß des pH-Meters 51 (Fa. Radiometer) überführt. Die angezeigten pH-Veränderungen im Inkubationsgemisch wurden über den angeschlossenen Servograph REA 310 (Fa. Radiometer) aufgezeichnet. Die gewählte Verstärkung ermöglichte eine Aufspreizung von 0,1 pH-Einheiten über die ganze Schreiberbreite. Nach einer Beobachtungszeit von etwa 1 Minute wurde zu den Zellen 0,1 ml 3-O-mgic zugegeben (Endkonzentration: 2 mM) und weitere 2 - 3 Minuten der pH im Außenmedium der Zellen verfolgt.

#### 8 Versuche zur preferentiellen Markierung des GTS II durch radioaktives Leucin während seiner Neusynthese

Die Möglichkeit, die Neusynthese des GTS II zu induzieren, legte den Versuch nahe, seine Komponenten selektiv zu markieren während ihrer Synthese durch markierte Aminosäuren in ausgehungerten Zellen. Das Übersichtsschema einer solchen differentiellen Doppelmarkierung nebst den unter B.9 bzw. B.13 zu beschreibenden Zellaufschluß- und Auftrennungsschritten ist in Abb. 1 wiedergegeben:

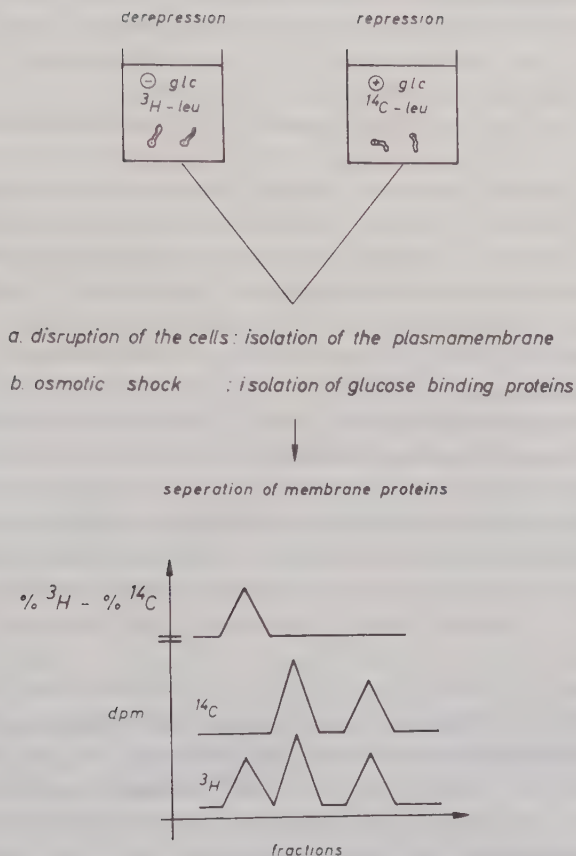


Abb. 1

Übersichtsschema zu Versuchen einer selektiven Markierung von dereprimierbaren Komponenten des Glucose-Transport-Systems (GTS II) von *Neurospora*.

Differentielle Doppelmarkierung einer durch Aushungerung dereprimierten und einer Glucose-reprimierten Hälfte einer Konidienpopulation durch  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Leucin; Vereinigung beider Subkulturen; alternative Isolierung von Plasmamembranvesikeln durch differentielle Zentrifugation oder periferer Membranproteine durch osmotischen Schock; Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese; Ermittlung dereprimierbarer, preferentiell  $^3\text{H}$ -markierter Proteinbanden.

325 ml einer Suspension von gewaschenen, vorher 3 Stunden in 1 % Glucose angekeimten Konidien mit dem Titer  $8 \times 10^5$ /ml wurden 15 Minuten lang unter Belüftung in Fries-Minimal-Medium ohne Glucose inkubiert (lag-Phase der GTS II-Derepression). 325 ml einer analogen Konidiensuspension wurden in Fries-Minimal-Medium plus 1 % Glucose 15 Minuten lang belüftet. Danach wurden zur ausgehungerten Suspension 5,7 ml einer  $^3\text{H}$ -Leucin-Lösung zugegeben (Endkonzentration:  $2,0 \mu\text{M}$ ; Endaktivität:  $1,37 \mu\text{Ci/ml}$ ; spezifische Aktivität:  $770 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ). Zu der anderen mit Glucose weitergekeimten Konidiensuspension wurden 5,7 ml einer  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Lösung zupipettiert (Endkonzentration:  $2,0 \mu\text{M}$ ; Endaktivität:  $0,137 \mu\text{Ci/ml}$ ; spezifische Aktivität:  $77 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ ). Beiden Subkulturen wurde unter Belüftung bei  $25^\circ\text{C}$  30 Minuten Zeit gelassen zum Einbau des angebotenen radioaktiven Leucins (Markiertes Leucin wurde in diesen Versuchen deswegen eingesetzt, da es einmal von Neurospora sehr rasch in die Zellen aufgenommen und eingebaut wird. Zum anderen empfiehlt sich Leucin zur Markierung von Komponenten der Lipoprotein-Zellmembran, da es bei Membranproteinen aufgrund seiner lipophilen Natur eine der stark vertretenen Aminosäuren ist). Nach 30 Minuten Markierungszeit wurde in beiden Subkulturen der Einbau weiteren radioaktiven Leucins durch Zugabe von unmarkiertem Leucin (Endkonzentration:  $1 \text{ mM}$ ) unterbunden. Die Zellen wurden weitere 10 Minuten belüftet, um die Beendigung der Synthese teilmarkierter Proteine zu ermöglichen und um den Einbau der markierten Proteine in die Plasmamembran zu gewährleisten. Hierzu sind nach eigenen Ergebnissen und Schätzungen anderer Autoren (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971) 5 - 10 Minuten nötig. Die markierten Zellen wurden dann abfiltriert, dreimal mit FCP plus  $1 \text{ mM}$  Leucin gewaschen und nach Bestimmung des Naßgewichts wie in B.9.1 bzw. B.9.2 beschrieben sofort weiterverarbeitet. Es wurden wie in Abb. 1 angegeben, entweder nach Zellaufschluß Plasmamembranen gewonnen, oder nach osmotischem Schock Schockproteine von ganzen Zellen isoliert. Diese beiden Zellfraktionen wurden weiter wie in 13. beschrieben, auf der SDS-Diskelektrophorese in Einzelproteine aufgetrennt, deren prozentuale  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität ermittelt wurde.

9 Gewinnung spezieller Zellfraktionen aus angekeimten Konidien bzw. Mycel von Neurospora

9.1 Osmotischer Schock (nach Hack, A., 1974)

Zur Isolierung der durch osmotischen Schock in Lösung zu bringenden Membranproteine von Neurospora wurden 1 000 ml einer Konidiensuspension vom Titer  $4 \times 10^6$ /ml bei 25 °C in FCP plus 2 % Glucose 20 Stunden lang angekeimt. Die Zellen wurden danach bzw. nach einer zusätzlichen Aushungerung von 2 Stunden auf einer Nutsche 3 mal mit FCP gewaschen und anschließend in 250 ml eines hypertonischen Mediums (siehe B.2) überführt (Schritt A). Darin verblieben die Zellen 15 Minuten lang unter kräftigem Schütteln. Danach wurden sie erneut abfiltriert und 15 Minuten lang bei 0 °C in eiskaltem H<sub>2</sub>O geschüttelt (Schritt B). Die nach Entfernen des Mycels erhaltene Schockflüssigkeit wurde vor ihrer Weiterverwendung bei -40 °C tiefgefroren und dann zur Einengung ca. 30 Stunden lang bei 0,15 Torr gefriergetrocknet.

9.2 Differentielle Zentrifugation aufgeschlossener Mycelien zur Isolierung von Plasmamembranen (modifiziert nach Matile, Ph., et al. 1967)

Die hier angewandte Zellmembranpräparationsmethode ist gekennzeichnet durch ein Aufsplittern des Plasmalemma in kleine Membranvesikel während des Zellaufschlusses mit Glasperlen. Diese Vesikel sind durch kurzzeitige Zentrifugation bei 2 000 bzw. 10 000 bzw. 40 000 g Beschleunigung, bei denen Zellwände, Zellkerne und Mitochondrien schon sedimentieren noch nicht fällbar, wohl aber durch eine einstündige Zentrifugation bei 150 000 g.

20 Stunden lang angekeimte Mycelien wurden in Portionen von 3 g Naßgewicht in 20 ml Aufschlußmedium (siehe B.2.) 1 Minute lang durch einen Küchenmixer in ihrer Länge auf ca. 2 mm reduziert, oder bei kleineren Mengen Mycel im Mörser mit Trockeneis zerrieben. Je 20 ml zerkleinertes Mycel und 10 ml Glasperlen ( $\phi = 0,5$  mm) wurden dann in einen 100 ml Aufschlußbecher

des Merckenschlager Homogenisiergerätes abgefüllt und 45 Sekunden lang bei maximaler Schüttelgeschwindigkeit und Kühlung durch flüssiges CO<sub>2</sub> aufgeschlossen. Die Zerstörung der Zellen wurde bei jedem Ansatz im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Der Rohaufschluß wurde durch Dekantieren von den Glasperlen befreit.

Das Schema der sich anschließenden differentiellen Zentrifugation ist aus Teil A der Tabelle 8 (Seite 82) zu ersehen. Durch eine niedertourige Zentrifugation des Homogenates (10 Minuten bei 2 000 g) in der Sorvall Kühlzentrifuge wurde ein zellfreier Extrakt gewonnen (S 2 000). Aus diesem wurde nach 10 Minuten Zentrifugation bei 10 000 g Beschleunigung die Mitochondrienfraktion (P 10 000) als Pellet abgetrennt, nach 10 Minuten Zentrifugation bei 40 000 g wurden aus dem Überstand (S 10 000) submitochondriale Partikel ins Pellet (P 40 000) geschlagen. Der Überstand (S 40 000) wurde nun 60 Minuten lang bei 150 000 g im Ti 60-Rotor in der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Hierdurch wurden alle löslichen Proteine (S 150 000) vom Pellet (P 150 000) abgetrennt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Zellfraktionen wurde nach Lowry, O. H., 1951 mit dem Folin-Phenol-Reagens im Beckman DB-Photometer gemessen.

### 9.3 Gleichgewichts-Zentrifugation von Membranvesikeln des P 150 000 im Sucrosegradienten

Zur Abtrennung mitochondrialer Membranvesikel und anderer mikrosomaler Partikel von den Zellmembranvesikeln des P 150 000 wurden Sucrosegradienten von 15 - 60 % w/w Sucrose benutzt. Dazu wurden 8 ml 60 %ige Sucrose mit 8,5 ml 15 %iger Sucrose im Gradientenmischer kontinuierlich vermischt und vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen des SW-27 Rotors (Beckman) einfließen gelassen. Nach 5 Stunden Aufbewahrung im Eisschrank zur Äquilibration von Temperatur und Dichte wurden die Gradienten mit 2 ml durch Pottern resuspendierten Membranvesikeln des P 150 000 beschickt. Die aufgetragene Menge an Protein betrug zwischen 10 mg und 30 mg. Nach 12 Stunden Zentrifugation bei 3 °C in der Beckman Ultrazentrifuge L 4 bei 27 000 rpm = 95 000 g Beschleunigung wurde der Gradient mit Hilfe des Ultra-

rac LKB-Fraktionssammlers in 20 Fraktionen fraktioniert, deren Proteinwert von einem Uvicord-Spektrometer aufgezeichnet wurde. Der Gehalt an mitochondrialen bzw. Zellmembran-Leitenzymen wurde durch Messung der SDH bzw.  $Mg^{2+}$ -ATPase bestimmt (siehe B.10.1 und B.10.2).

10 Bestimmung der Aktivität von mitochondrialen und Zellmembran-Leitenzymen in verschiedenen Zellfraktionen

10.1 Messung der Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase  
(EC 1.3.99.1.) modifiziert nach Tisdale, H. D., 1967

Dieses Enzym diente als Leitenzym zur Bestimmung des Anteils mitochondrialer Kontaminationen in Plasmalemma-Präparationen.

Die Succinatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat durch Elektronenübertragung auf Cytochrom c. Gemessen wird die Extinktionszunahme des reduzierten Cytochrom c bei 550 nm. Ein durch Antimycin A nichthemmbarer Anteil der Aktivität zeigt Bakterienkontamination an.

Reaktionsgemisch

|                                                         |               |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| Succinat (1 M)                                          | 0,1 ml        |
| Phosphatpuffer =                                        |               |
| ( $KH_2PO_4$ 0,2 M; EDTA 2 mM; Tris ad $p_H 7,2$ )      | 1,0 ml        |
| Ferricytochrom (52 mg/ml)                               | 0,05 ml       |
| KCN, jeweils frisch eingewogen (0,05 M = 32,5 mg/10 ml) | 0,05 ml       |
| $H_2O$                                                  | ad 2,0 ml     |
| Enzym                                                   | 0,01 - 0,8 ml |
| Antimycin A (10 $\mu g/ml$ ) am Ende des Tests          | 0,02 ml       |

In Abb. 2 ist ein Beispiel einer Messung der SDH-Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen von Neurospora wiedergegeben. Teil A zeigt die Aufzeichnung der Extinktionszunahme (= Zunahme der Konzentration des reduzierten Cytochrom c) in drei Testgemischen nach unterschiedlicher Zugabe (3 - 10 µg Protein zu 2 ml Testgemisch) von mitochondrialen Proteinen des Pellets nach 10 000 g Beschleunigung. In Teil B sind Messungen der SDH-Kontamination im P 150 000 nach unterschiedlicher Zugabe (70 - 210 µg Protein zu 2 ml Testgemisch) mikrosomaler Proteine wiedergegeben.

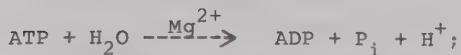
Die Zunahme der Extinktion ist linear über 15 Minuten, sie ist proportional der Menge des eingesetzten Enzyms und vollkommen zu hemmen durch Zugabe des Hemmstoffes Antimycin A (2 µg/2 ml Testgemisch), welcher durch Bindung an den Komplex IV der Atmungskette den Elektronenfluß vom Succinat auf das Cytochrom c unterbindet (siehe Kurve c in Teil A und Kurve b in Teil B).

Nach Ermittlung der spezifischen Aktivitäten (167 bzw. 7,6 nanoMole red. Cytochrom c/min x mg Protein) zeigt sich, daß in dieser Präparation im P 150 000 nur mehr 4,5 % der SDH-Aktivität des Mitochondrienpellets als Kontamination zu messen sind.

## 10.2 Messung der $Mg^{2+}$ -ATPase (EC 3.6.1.3.)

Dieses Enzym dient als Leitenzym bei Isolierungen von Plasmamembranen.

### Reaktionsmechanismus



Die  $Mg^{2+}$ -ATPase katalysiert die Spaltung von ATP in ADP und  $P_i$ , wobei noch ein Proton freigesetzt wird. Gemessen werden kann die Reaktion entweder an der Wasserstoffelektrode oder wie im folgenden angegeben durch die Bestimmung der Menge des freigesetzten  $P_i$ . Es ist eine mitochondriale, durch Oligomycin hemmbare und eine durch Oligomycin nichthemmbare Zellmembran-ATPase zu unterscheiden.

### Reaktionsgemisch

|                      |            |                 |
|----------------------|------------|-----------------|
| ATP                  | 0,1 M      | 0,010 ml        |
| MgCl <sub>2</sub>    | 1,0 M      | 0,010 ml        |
| Oligomycin +         | 1 mg/ml    | 0,010 ml        |
| Enzym ad 0,05 - 1 mg | Protein/ml | 0,010 - 0,50 ml |
| Tris - HCl pH 7,5    | 0,05 M     | ad 1,000 ml     |

### ATPase - Inkubation

Nach Inkubationszeiten von 0, 3, 6, 9 und 12 Minuten im Wasserbad bei 35 °C wurden je 0,15 ml des Reaktionsgemisches entnommen und in Nethelerbecherm mit 0,05 ml 50 %iger TCA = Trichloressigsäure überführt. Das dadurch ausgefällte Protein wurde in der Eppendorf-Zentrifuge niedergeschlagen.

### Reagentien zum P<sub>i</sub>-Test

#### Ammoniummolybdatlösung:

12,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O werden in 100 ml heißem H<sub>2</sub>O gelöst und nach Abkühlen und vorsichtiger Zugabe von 125 ml 10 normaler H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O eingestellt.

#### Metol-Reduktionsreagens:

|                                                                                   |                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 25 g K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in 60 ml H <sub>2</sub> O lösen | nach dem Vereinigen auf       |
| 0,2 g Metol in 10 ml H <sub>2</sub> O lösen                                       | 100 ml auffüllen und durch    |
|                                                                                   | ein Faltentrichter filtrieren |

20 ml Filtrat verwerfen, der Rest ist in dunkler Flasche 2 Wochen haltbar.

### Reaktionsgemisch zum P<sub>i</sub>-Test

(modifiziert nach Fiske, C. H.; Subarrow, Y., 1925)

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Zentrifugationsüberstand | 0,150 ml |
| H <sub>2</sub> O dest.   | 0,350 ml |
| Ammoniummolybdatlösung   | 0,100 ml |
| Metol-Reduktionsgemisch  | 0,050 ml |

Nach 10 Minuten zum Abstoppen der Farbreaktion:  
Natriumacetat (4 M)                      0,500 ml

5 Minuten danach wurde das Reaktionsgemisch in eine 1 ml-Küvette überführt und die Extinktion bei 578 nm gegen einen Blindwert im Eppendorf-Spektrometer gemessen. Mit fortschreitender Inkubationszeit des ATPase-Gemisches, d. h. fortschreitender  $P_i$ -Freisetzung nimmt die Extinktion in den einzelnen Proben zu.

Abb. 3 zeigt Beispiele von Messungen der Oligomycin-sensiblen bzw. Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase in denselben Zellfraktionen, deren SDH-Aktivität unter 10.1 bestimmt wurde.

In Teil A wurde die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus ATP nach Zugabe von 64  $\mu g$  Protein des mitochondrialen Pellets verfolgt und zwar einmal ohne Oligomycin und einmal nach Zugabe von 10  $\mu g$  Oligomycin zum Testgemisch. In Teil B ist die ATP-Spaltung, die durch Zugabe von 100  $\mu g$  Protein des P 150 000 katalysiert wird, mit und ohne Oligomycin wiedergegeben.

Die colorimetrisch gemessene  $P_i$ -Konzentration im Testgemisch nimmt in allen Fällen über 12 Minuten linear zu. Die mitochondriale  $Mg^{2+}$ -ATPase-Aktivität ist nahezu vollkommen durch Oligomycin hemmbar, die  $Mg^{2+}$ -ATPase-Aktivität des P 150 000 ist hier etwa zur Hälfte durch Oligomycin hemmbar. Dies deutet jedoch nicht auf eine 50 %ige Kontamination des P 150 000 mit mitochondrialen Proteinen hin, da die spezifische Aktivität der Oligomycin-sensiblen ATPase in der Mitochondrienpräparation sechsfach höher lag als die spezifische Aktivität der Oligomycin-resistenten ATPase im P 150 000 (122 nMole  $P_i$ /min/mg Protein gegenüber 22 nMole  $P_i$ /minxmg Protein).

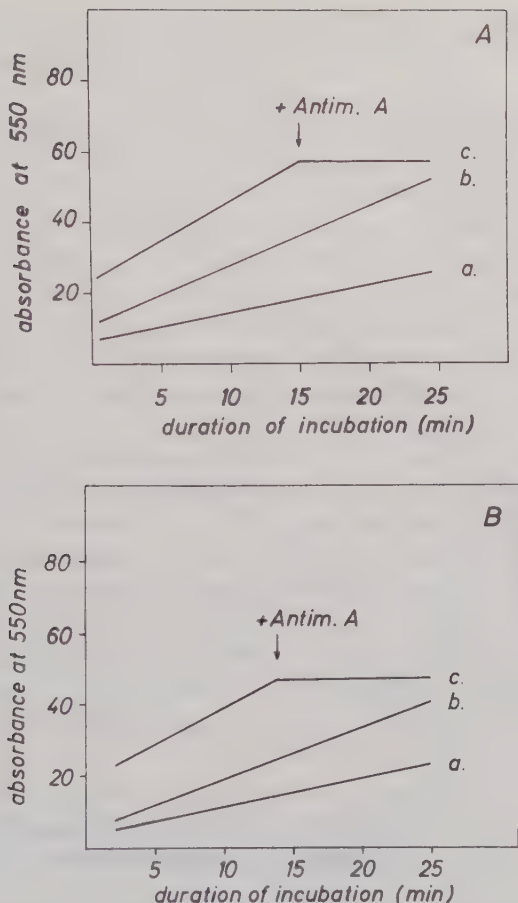


Abb. 2

Messung der Succinat-Cytochrom-C-Oxidoreduktase-(SDH)-Aktivität verschiedener Zellfraktionen von *Neurospora*. Aufzeichnung der Extinktionszunahme bei 550 nm (= Zunahme der Konzentration an reduziertem Cytochrom c) über ca. 15 Minuten.

Teil A: Kurve a, b, c = Zugabe unterschiedlicher Mengen (3, 6, 9  $\mu$ g) von Protein des P 10 000 zum Testgemisch.

Teil B: Kurven a, b, c = Zugabe unterschiedlicher Mengen (70, 140, 210  $\mu$ g) von Protein des P 150 000 zum Testgemisch.

Hemmung der SDH-Aktivität in Teil A und B bei den Kurven c von 1  $\mu$ g/ml Antimycin A nach ca. 15 Minuten.

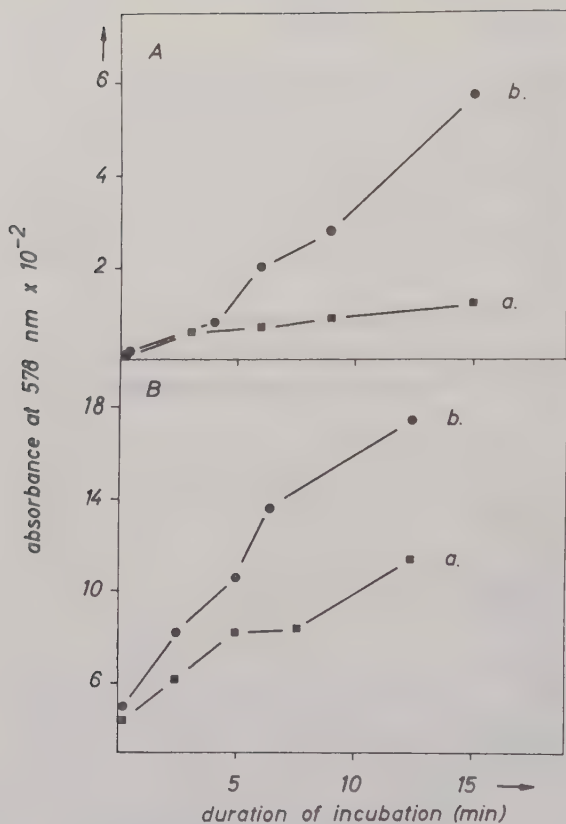


Abb. 3

Messung der Oligomycin-sensiblen und der Oligomycin-resistenten ATPase-Aktivität verschiedenener Zellfraktionen von Neurospora; Kinetik der Konzentrationszunahme des aus ATP freigesetzten  $P_i$  im Testgemisch;

Teil A: Zugabe von 64 µg mitochondrialer Proteine des P 10 000 zu einem Oligomycin-haltigen (10 µg/ml) Testgemisch (Kurve a) bzw. zu einem Oligomycin-freien Testgemisch (Kurve b).

Teil B: Zugabe von 100 µg Protein des P 150 000 zu einem Oligomycin-haltigen (10 µg/ml) Testgemisch (Kurve a) bzw. zu einem Oligomycin-freien Testgemisch (Kurve b).

11 Herstellung elektronenoptischer Bilder von Dünnschnitten der Membranvesikel des P 150 000

Die Membranvesikel der an Oligomycin-resistenten ATPase reichen Fraktionen im Sucrosegradienten (B.9.3 und C.10.1) wurden nach Verdünnen als Pellet niedergeschlagen. Nach Fixierung mit einer auf pH 7,2 eingestellten Lösung von Osmiumsäure (1 %) und Kaliumbichromat (2,5 %) und dreimaliger Zentrifugation und Resuspension in 30 %, 50 % bzw. 70 % wässrigem Aceton wurden die Proben in einer neutralisierten Lösung von 1 % Phosphowolframsäure und 0,5 % Uranylacetat in 70 % wässrigem Aceton 60 Minuten lang kontrastiert. Nach Entwässerung durch 90 %iges und 100 %iges Aceton (jeweils 60 Minuten lang) wurde das Pellet in einem Vestopal-Aceton-Gemisch 1 : 1, danach 2 : 1 und 3 : 1 und schließlich in reinem Vestopal mit 1 % Aktivator und 1 % Initiator 48 Stunden bei 60 °C inkubiert zur Polymerisation. Mit Glasmessern wurden Dünnschnitte hergestellt, die in 0,1 %iger Phosphowolframsäure zum Nachkontrastieren aufgefangen wurden. Die Schnitte der Membranvesikel wurden auf Formvar-umhüllten Kupfernetzen aufgefangen und im ZeissEM 9 A Elektronenmikroskop bei 28 200facher und 84 600facher Vergrößerung durchmustert und photographiert.

12 Versuche zur Messung der Bindeaffinität von Neurospora-Zellmembranen für Glucose

Zur Prüfung der Frage, ob die nach B.9 präparierten Zellmembranvesikel im P 150 000 bzw. die noch mit Zellmembranen behaftete Zellwandfraktion im P 2 000 eine Bindeaffinität für Glucose besitzen, wurde einmal die Methode der Gleichgewichtsdialyse und zum anderen die Silicon-Filtrations-Zentrifugationstechnik angewandt.

12.1 Gleichgewichtsdialyse

1 ml suspendiertes P 150 000 (4,6 mg) oder 1 ml P 2 000 (1,7 mg) bzw. Tween-80 Extrakte (4 %ig) dieser Fraktionen wurden über Nacht in Dialyseschläuchen (Viskink-Dialyseschläuche, Type 8/32,

Serva Heidelberg) gegen 30 ml  $^{14}\text{C}$ -Glucose-haltigen Dialysepuffer dialysiert, dem zur Vermeidung von Bakterien- und Pilzkontamination Antibiotika beigegeben waren. Eine Bindung von Glucose an die eingesetzten Membranen sollte sich als eine Anreicherung der Radioaktivität im Dialyseschlauch zu erkennen geben.

#### Dialyse-Puffer:

Tris-HCl pH 7,2; 0,025 M

0,3  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glucose; spez. Akt.: 0,3  $\mu\text{Ci}/2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{Molen}$

Streptomycin 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Cycloheximid 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Natriumazid 10 mM

Eine spezifische Bindung von  $^{14}\text{C}$ -Glucose an einzelne, limitierte Bindungsstellen sollte durch Zugabe von  $^{12}\text{C}$ -D-Glucose kompetitiv unterbunden werden können. Dazu wurden Kontrolldialysen mit 0,3  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Glucose mit einer etwa um den Faktor  $10^4$  niedrigeren spezifischen Aktivität von 0,3  $\mu\text{Ci}/30$   $\mu\text{Molen}$  jeweils gleichzeitig angesetzt.

Nach 20 Stunden Dialyse wurden je 10 Proben à 0,05 ml aus dem Außenmedium und je 10 Proben à 0,05 ml aus dem Dialyseschlauch entnommen und in Scintillationsgläsern eingetrocknet. Danach wurde die Radioaktivität durch 200  $\mu\text{l}$  Soluene gelöst und durch Zugabe von 10 ml Scintillationsflüssigkeit zählbar gemacht.

#### 12.2 Silicon-Filtrations-Zentrifugation

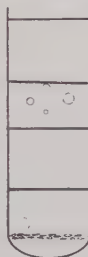
Zellmembranvesikel des P 150 000 wurden 20 Minuten lang bei 37 °C in einem  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-haltigen Inkubationsgemisch folgender Zusammensetzung gehalten:

870  $\mu$ l Tris-HCl pH 7,5; 5 mM;  
 10  $\mu$ l  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc  $\approx 1 \times 10^{-2}$   $\mu$ Ci; spez. Akt.:  $10^{-2}$   $\mu$ Ci/o, 8 nMolen  
 + 10  $\mu$ l  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc verschiedener Konzentration (siehe unten)  
 + 10  $\mu$ l  $^3\text{H}_2\text{O} \approx 0,5$   $\mu$ Ci  
 + 100  $\mu$ l Membranvesikel des P 150 000 ad 1 mg Protein/ml  
 20  $\mu$ l Streptomycin ad 250 mg/ml

Tabelle 1 zeigt die 8 zu einem Versuch gehörenden verschiedenen Versuchsansätze.

Nach der Inkubation mit dem radioaktiven Substrat wurden Proben entnommen und danach die Membranvesikel in einen mit folgenden Schichten gefüllten 5-ml-Zentrifugen-Becher des SW 50.1 Beckmann-Rotors überführt:

2 ml Paraffinöl  
 1 ml Inkubationsgemisch  
 1 ml Silicon 100 AR  
 0,5 ml CsCl 1,13 g  
 0,5 ml CsCl 1,40 g



Membranvesikel vor  
der Zentrifugation

Membranvesikel nach  
der Zentrifugation

Nach 60minütiger Zentrifugation bei 40 000 rpm  $\approx 150$  000 g wurden die 8 Zentrifugenbecher bei  $-30^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Die CsCl-Fraktion, mit den nun in der Grenzschicht zwischen schweren und leichten CsCl enthaltenen Membranvesikeln, wurde nach Zerschneiden des Röhrchens von dem nach wie vor flüssigen Silicon befreit. Nach dem Homogenisieren wurde die von den Membranvesikeln in diese Fraktion eingetragene Radioaktivität bestimmt und als % der in 1 ml Inkubationsgemisch enthaltenen Radioaktivität berechnet.

Tabelle 1

| Röhrchen-Nr.                                 | 1      | 2      | 3      | 4                | 5               | 6 | 7 | 8 |
|----------------------------------------------|--------|--------|--------|------------------|-----------------|---|---|---|
| variabele<br>Zuaben im<br>Inkubationsgemisch |        |        |        |                  |                 |   |   |   |
| $^{12}\text{C-3-O-mgic}$                     | 1,0 mM | 0,5 mM | 0,1 mM | 50 $\mu\text{M}$ | 5 $\mu\text{M}$ | - | - | - |
| $^{14}\text{C-3-O-mgic}$                     | +      | +      | +      | +                | +               | + | - | + |
| $^3\text{H}_2\text{O}$                       | -      | -      | -      | -                | -               | - | + | - |
| P 150 000                                    | +      | +      | +      | +                | +               | + | + | - |

Glucose-Bindungstest der Zellmembranvesikel des P 150 000 durch die  
Silicon-Filtrations-Zentrifugation; Angabe der variablen Anteile  
in den verschiedenen Inkubationsgemischen der Kontroll- und Test-Röhrchen

### 13 Auftrennung der Proteine verschiedener Zellfraktionen in der SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese

#### 13.1 Herstellung der Gele

Zur Herstellung von Gelen mit 10 % Acrylamid (nach Glossmann, H.; Lutz, F., 1970) wurden 14 cm lange Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm verwandt. Es wurde im Vakuum entgaste Trenngelmischung 10 cm hoch eingeführt (O<sub>2</sub> verhindert die Polymerisation des Geles).

Nachdem zwei Stunden Zeit gegeben worden war zur Polymerisation des Trenngeles, wurde 1,5 cm hoch frisch entgaste Sammelmischung aufgetragen.

Es wurde wiederum zwei Stunden Zeit gegeben zur Polymerisation.

Kurz vor dem Auftrag auf die Gele war die Solubilisierung der aufzutrennenden Membranproteine 3 Minuten lang bei 100 °C in folgendem Gemisch erfolgt:

350 µl Membranvesikel ad 0,5 mg Gesamtprotein  
100 µl SDS 25 %ig  
50 µl Mercaptoäthanol

Mercaptoäthanol sorgt hierbei durch Reduktion von S-S-Brücken für die Freilegung der einzelnen Polypeptidketten, SDS befreit diese aus dem Lipidkomplex der Membran und schirmt durch Maskierung die Ladungen der Membranproteine ab.

Auf die fertigen Gele in den Röhrchen wurde das zu trennende Proteingemisch aufgetragen. Als günstiger Einsatz erwiesen sich 20 - 100 µg Protein pro Gel.

Die Kathode (-) wurde an das obere, die Anode (+) an das untere Becken angeschlossen. Die angelegte Stromstärke betrug in den ersten 30 Minuten 0,2 mA/Gel und danach 4 Stunden lang 2 - 5 mA/Gel.

### 13.2 Färbung der Proteinbanden in den Gelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig mit Hilfe einer langen Injektionsnadel, durch die 10 %iges Glycerin zwischen Glas und Gel geführt wurde, aus den Röhrchen befreit. Zur Überprüfung der Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine wurden die Gele über Nacht in einer Lösung von 1 % Comassie-Blau in 7 %iger Essigsäure und 50 % Methanol gefärbt. Anschließend wurden die Gele zweimal 15 Stunden lang bei 50 °C bei ständigem Schütteln in 7 %iger Essigsäure entwickelt, d. h. von nicht gebundenem Farbstoff befreit.

### 13.3 Aufbereitung der Proben für die Radioaktivitätsmessung

Gele mit guter Auftrennung und geraden Banden wurden auf dem Joice-Löbel-Gelschneider mit flüssigem CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O festgelegt, in 1 mm breite Trommeln zerlegt und anschließend der Radioaktivitätszählung zugänglich gemacht. Dazu wurden die Gelfraktionen in die Zählgläschen übertragen und mit 0,7 ml Soluene und 0,02 ml H<sub>2</sub>O versetzt. Soluene, eine starke organische Base (Quarternäres Ammoniumhydroxyd), ist in der Lage, Peptidbindungen zu spalten (dem Informationsblatt "Soluene TM 100, Lösungsvermittler für die Scintillationszählung" der Fa. Packard entnommen). Das Wasser ermöglicht die Dissoziation der Base Soluene und damit ihr Wirksamwerden. Die Zählgläschen wurden bei 60 °C im Brutschrank über Nacht geschüttelt, bis eine Schwellung der Gelstücke auf die doppelte Größe eingetreten war.

Nach dem Abkühlen wurden 10 ml Scintillationsgemisch (siehe 3) zugegeben, nochmals 2 Stunden zum Äquilibrieren bei Zimmertemperatur geschüttelt und danach gezählt. Nahezu 95 % der eingebrachten Radioaktivität wird durch diese Elutionsmethode aus den Gelfractionen freigesetzt in das Scintillationsgemisch und unterliegen somit Quenchbedingungen, die durch Standardisierungsmethoden zu ermitteln sind.

#### 13.4 Automatische Quenchkorrektur

Von  $^3\text{H}$ -Kernen emittierte energiearme Elektronen werden gänzlich anders als von  $^{14}\text{C}$ -Kernen emittierte energiereiche Elektronen von den verschiedenen Beimengungen des Scintillationsgemisches (z. B. Soluene) gequenchet, d. h. abgebremst bzw. gelöscht. Um dennoch eine quantitative Aussage über die in ein- und derselben Gelfraktion enthaltenen  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität machen zu können, wurden die vom Scintillationszähler ermittelten Impulse (cpm) durch automatische Quenchkorrektur in die effektiven Zerfälle (dpm) umgerechnet. Dies war nötig, weil man innerhalb eines Geles mit Fraktionen von ganz verschiedener Quenchintensität zu rechnen hat, etwa weil manche Proben zur Elution mehr Soluene bedürfen. Die Umrechnung wurde erleichtert durch die Übernahme der nötigen Formeln und Eichkurven in ein Rechenprogramm des Tischrechners Diehl Algotronic, der bei der Zählung mit dem Scintillationsspektrometer verbunden wurde. Das eingespeiste Programm ermöglichte schließlich nach einer kurzen Vorzählung zur Aufsummierung der insgesamt in dem betreffenden Gel enthaltenen  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -dpm (100 %) und einer längeren, genauen Hauptzählung den Ausdruck folgender Zahlenwerte pro Gelfraktion:

|                     |                                                     |
|---------------------|-----------------------------------------------------|
| Proben-Nr.          | Quotient der dmp $\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ |
| Zählzeit            | % der $^3\text{H}$ -dpm/Fraktion                    |
| cpm $^3\text{H}$    | % der $^{14}\text{C}$ -dpm/Fraktion                 |
| cpm $^{14}\text{C}$ | % $^3\text{H}$ - % $^{14}\text{C}$                  |
| dpm $^3\text{H}$    |                                                     |
| dpm $^{14}\text{C}$ |                                                     |

Die Zählzeit wurde so gewählt, daß je Probe jeweils mindestens 3 000 Impulse gezählt wurden, was einem statistischen Fehler von der Messung von  $\pm 3,8 \%$  bei 95 % Wiederholungswahrscheinlichkeit entspricht.

14 Vergleich des Sauerstoffverbrauches von Glucose- und Glycerin-angekeimten bzw. ausgehungerten Konidien

100 ml einer Konidiensuspension der Konzentration  $8 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in Fries-Minimalmedium + 1 % Glucose 3 Stunden lang angekeimt. Danach wurde die Glucose sorgfältig ausgewaschen und die Zellen auf dreierlei Weise in drei Subkulturen 4 Stunden lang weitergezogen:

Subkultur a: Aushungerung

Subkultur b: Weiterkeimung in 2 % Glycerin

Subkultur c: Weiterkeimung in 1 % Glucose

Während der 4stündigen unterschiedlichen Nachbehandlung der Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten aus allen drei Subkulturen 2 ml-Aliquote abgezweigt, deren Sauerstoffverbrauch nach vorheriger  $O_2$ -Sättigung mit der Sauerstoff-Elektrode aufgezeichnet wurde. Die Sedimentation der angekeimten Zellen wurde durch behutsames Rühren mit dem Magnetrührer verhindert.

## 15 Statistische Sicherung der Meßdaten

### 15.1 Mutungsgrenzen

Zur Beurteilung der Signifikanz der Meßwerte wurde, soweit nicht anders angegeben, der einfache Standardfehler des Mittelwertes ( $s_m$ ) von Daten mehrerer Versuche berechnet und als Mutungsgrenze in Tabellen und Abbildungen angegeben.

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} ; \quad s = \sqrt{\frac{\text{Summe der Abweichungsquadrate}}{\text{Anzahl der Freiheitsgrade}}} ;$$

Hierin ist  $n$  der Stichprobenumfang und  $s$  die Standardabweichung der Meßwerte.

### 15.2 Regressionsanalyse

Wo erwähnt, wurden bei linearen Zusammenhängen die Konstanten der Geradengleichung

$$Y = a + bx;$$

durch Regressionsanalyse mit Hilfe des Tischrechners Wang 500 ermittelt; hierbei ist:

$a$  = Schnittpunkt der Geraden mit der  $y$ -Achse;

$b$  =  $b_{y/x}$  = Regressionskoeffizient; Steigung der den Zusammenhang beschreibenden Geraden

$$b_{y/x} = \frac{\text{Summe der Abweichungsprodukte } (x,y)}{\text{Summe der Abweichungsquadrate } (x)} ;$$

$S_{x \cdot y}$  = Standardschätzfehler; er gibt die Standardabweichung der Abschätzung eines jeden  $y$ -Wertes an (nach Fels, E. M., 1967).

### 15.3 t-Test

Zur Überprüfung der Unterschiede zwischen zwei Stichproben mit den Umfängen  $n_1$  und  $n_2$  und den Streuungen  $s_1$  und  $s_2$  wurde der t-Test vorgenommen. Die Nullhypothese, daß ihre Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  sich mit  $\alpha = 1\%$  bzw.  $\alpha = 5\%$  Irrtumswahrscheinlichkeit nur zufällig unterscheiden ist anzunehmen, wenn der für die Testgrößen berechnete t-Wert ( $t_b$ ) kleiner ist als der aus Tabellen entnommene t-Wert ( $t_T$ ) für  $\alpha$  und den Freiheitsgrad ( $f = n_1 + n_2 - 2$ ).

$$t_b = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{sd} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} ; \quad sd = \sqrt{\frac{s_1^2 (n_1 - 1) + s_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

## C. Ergebnisse

### Teil I      Versuche zur Regulation und zur Energetik des GTS II

#### 1            Messung der 3-O-Methyl-D-Glucose-Aufnahme zur Bestimmung der GTS II-Aktivität von Neurospora

Im nachfolgend aufgeführten Standard-Experiment zur Glucose-Aufnahme soll dargestellt werden, wie die Aktivität des GTS II in den weiteren Transportversuchen gemessen wurde. Vegetative Kondidiosporen von *Neurospora crassa* wurden nach B.7.1 zur Stimulation des Stoffwechsels 3 Stunden lang in Glucose angekeimt. Die etwa kugeligen Konidien mit einem Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$  haben nach dem Ankeimen eine Keimschlauchlänge von etwa 15  $\mu\text{m}$ . Solche Zellen wurden nach B.7.3 in dem  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-haltigen Inkubationsgemisch resuspendiert. Das 3-O-Methyl-derivat der Glucose wird vom GTS II wie diese in die Neurospora-zelle eingeschleust, kann aber von ihr nicht verstoffwechselt werden.

Bei der hier eingestellten Substratkonzentration von 0,1 mM ist nur das hochaffine Glucose-Transport-System (GTS II) aktiv, das bei 30  $\mu\text{M}$  3-O-mglc halbgesättigt ist. Das niederaffine Glucose-Transport-System (GTS I), das erst bei 23 mM 3-O-mglc halbgesättigt ist, geht nicht mit ein in die Analyse.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen mit dem Substrat  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc wurden Proben entnommen und die in die Zellen gelangte Radioaktivität gemessen. In Abb. 4 ist die Zunahme der in den Zellen festgestellten Radioaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen. Kurve a stellt Werte einer 3 Stunden lang in Glucose angekeimten Subkultur a dar. Kurve b zeigt Werte einer ebenso angekeimten, danach jedoch 120 Minuten ausgehungerten Subkultur b. Kurve c enthält Daten, die mit einer angekeimten und ausgehungerten Subkultur c gewonnen wurden, der jedoch zusätzlich zum Substrat  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc noch  $10^{-2}$  M Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) im Inkubationsgemisch beigegeben worden war. Die durch Regressionsanalyse ermittelte Steigung der drei Kurven (cpm/min) gibt die Aufnahmerate, das heißt die unterschiedliche GTS II-Aktivität der drei unterschiedlich behandelten Subkulturen wieder.

Zu Vorgängen wie der hier dargestellten Glucose-Aufnahme ist allgemein folgendes zu bemerken: Zu Beginn der Inkubationszeit der Zellen mit dem Substrat wird dieses vom Transportsystem mit einer hohen Anfangsrate aufgenommen. Die Geschwindigkeit der Nettoaufnahme der in den Zellen nachweisbaren Substratmoleküle wird jedoch bald geringer, da der Ausstrom der eingeschleusten Moleküle (efflux) den Einstrom (influx) mit steigender Innenkonzentration mehr und mehr aufwiegt.

$$\text{Nettoaufnahme} = \text{influx} - \text{efflux}; \quad (1)$$

Hierbei ist der jeweilige influx von der gebotenen Außenkonzentration an Substrat ( $C_{\text{ex}}$ ), von der Affinität des entsprechenden Systems zum Substrat ( $K_m$ ) sowie von der bei Substratsättigung des Transportsystems meßbaren maximalen Transportrate ( $V_{\text{max}}$ ) in folgender Weise abhängig:

$$\text{influx} = \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{ex}}}{K_m + C_{\text{ex}}}; \quad (2)$$

Der efflux ist (in den einfachen Fällen, in denen die Dissoziationskonstante des Carriers auf der Membranaußenseite die gleiche Größe besitzt wie auf der Membraninnenseite) entsprechend von  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  sowie von der jeweiligen erreichten Innenkonzentration an Substrat ( $C_{\text{in}}$ ) abhängig:

$$\text{efflux} = \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{in}}}{K_m + C_{\text{in}}}; \quad (3)$$

Die Netto-Substrat-Aufnahme bzw. Substrat-Abgabe eines Transportsystems kann dann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\text{Netto-flux} = \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{ex}}}{K_m + C_{\text{ex}}} - \frac{V_{\text{max}} \times C_{\text{in}}}{K_m + C_{\text{in}}}; \quad (4)$$

Bei allen in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Glucose-Aufnahme-Experimenten wurden immer Anfangsraten der Aufnahme nach kurzer Inkubationszeit gemessen, um möglichst direkt den influx zu ermitteln. Wie in Abb. 4, Kurven a - c, zu sehen ist, nimmt die Netto-Aufnahmerate von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc innerhalb der gewählten 5,5 Minuten Inkubationszeit durch zunehmenden efflux zwar schon leicht ab, dennoch schien die Berechnung einer gemittelten Steigung unter Berücksichtigung aller vier Meßpunkte gerechtfertigt.

Im einzelnen zeigt sich in Abb. 4, Kurve a, daß die Aufnahme-rate der Subkultur a, die drei Stunden in 1 % Glucose angekeimt worden war, relativ niedrig war ( $92 \text{ cpm/min} \approx 0,02 \text{ n Mol/Minute} \times \text{mg Zellprotein}$ ). Nach einer 120minütigen Aushungerung solcher angekeimter Zellen (Subkultur b, Kurve b) ist eine 16fache Steigerung der Aufnahmerate ( $1495 \text{ cpm/min} \approx 0,32 \text{ n Mol/Minute} \times \text{mg Zellprotein}$ ) festzustellen. Die Azid-behandelte Subkultur c zeigt keine meßbare Aufnahmerate. Die Radioaktivität pro Probe steigt mit zunehmender Inkubationszeit nicht an (Kurve c).

Aus dem Verlauf der Kurve c in Abb. 4 ist zu ersehen, daß eine Abhängigkeit der Aktivität der GTS II vom Energiestoffwechsel der Neurosporazelle besteht. In den Zellen der Subkultur c, deren oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien durch das zugegebene  $\text{NaN}_3$  gehemmt ist, kann lediglich der 3-O-mglc-Konzentrationsunterschied zwischen Außenmedium und Zellinnerem ausgeglichen werden. Dieser sehr rasche Vorgang, der auch vom GTS II katalysiert wird, kann mit der hier gewählten Meßtechnik nicht aufgelöst werden.

Aus der über den Konzentrationsausgleichswert der Subkultur c hinausgehenden Radioaktivität der Subkulturen a und b ist zu schließen, daß in diesen nicht durch  $\text{NaN}_3$  gehemmten Subkulturen eine Akkumulation der  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc in den Zellen stattgefunden hat. Das GTS II ist demnach ein aktives Transportsystem. Zur eingehenderen Analyse dieses Befundes werden unter C.6 weitere Experimente zur Frage der Kopplung des aktiven Glucose-Transportes mit dem Zellstoffwechsel dargestellt.

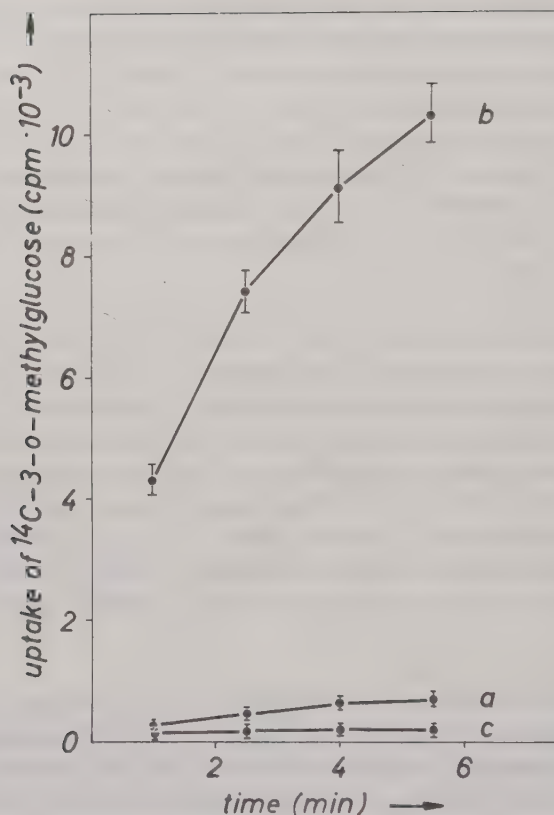


Abb. 4

Aufnahme von Glucose in angekeimte Konidien.

Gemessen Radioaktivität in je  $2 \times 10^7$  Zellen nach bis zu 5,5minütiger Inkubation mit dem Glucose-Analogen  $^{14}\text{C}$ -3-O-Methylglucose (3-O-mglc,  $10^{-4}$  M);

Kurve a:  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahme nach 3stündiger Ankeimung der Zellen in 1 % Glucose;

Kurve b:  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahme nach 3stündiger Ankeimung und anschließender 2stündiger Aushungerung der Zellen;

Kurve c: Vorbehandlung der Zellen wie bei Kurve b im Inkubationsgemisch jedoch zusätzlich zum radioaktiven Substrat  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-2}$  M);

Aus der 16fach stärkeren Steigung der Kurve b verglichen mit der Kurve a in Abb. 4 ist auf eine Stimulierbarkeit der GTS II-Aktivität durch eine Aushungerung der angekeimten Neurospora-zellen zu schließen. Es bieten sich zwei alternative Erklä-rungsvorschläge zur Deutung dieser Aktivitätssteigerung des GTS II an. Einmal kann eine verringerte Substrat- oder feed-back-Hemmung auf Proteinebene angenommen werden. Hierbei wird vorausgesetzt, daß die Aushungerung den internen Glucosespie-gel in den Zellen senkt, was eine Verschiebung des Dissozia-tionsgleichgewichtes zwischen Substrat-beladenen und freien Glucose-Carriern bewirken könnte. Mehr unbeladene Carriermole-küle sollten demnach nach Aushungerung der Zellen für den Ein-wärtstransport von Glucose zur Verfügung stehen. Die Regula-tion der GTS II-Aktivität würde nach diesem Erklärungsvorschlag also auf der Ebene der in der Zellmembran integrierten Trans-portkomponenten zu suchen sein.

Zum anderen kann eine Derepression eines oder mehrerer Gene, die Komponenten des GTS II codieren, diskutiert werden. Hier-bei wird angenommen, daß nach Aufnahme der zugegebenen Glucose in die Neurosporzellen die Transkription eines oder mehrerer GTS II-spezifischer Gene reprimiert wird. Die Senkung der in-ternen Glucosekonzentration durch Aushungerung der Zellen soll zur Beendigung der Glucoserepression, d. h. zur Neusynthese des GTS II bzw. einer wesentlichen, Geschwindigkeits-bestimmen-den Komponente führen. Versuche zur Entscheidung zwischen bei-den, bzw. weiteren denkbaren Erklärungsvorschlägen werden im folgenden unter C.4 aufgeführt.

## 2 Zeitmuster der Aktivitätsveränderungen des GTS II während der Ankeimung von Neurosporzellen nach Aushungerung bzw. Glycerinweiterkeimung

In dem nachfolgend dargestellten Experiment sollen die Aktivi-tätsveränderungen des GTS II nach verschiedenen Ankeimungszei-ten von Konidiosporen und nach verschiedenen Aushungerungszei-ten von 3 Stunden angekeimten Zellen dargestellt werden. Hier-durch soll eingehender als in Abb. 4 das ganze Zeitmuster der Transportratenveränderungen, d. h. die Geschwindigkeit darge-

stellt werden, mit der die angekeimten Zellen nach Entzug der Glucose im Außenmedium durch Regulation der GTS II-Aktivität auf diese neue Umweltsituation reagieren.

Dazu wurde eine größere Konidienpopulation in 1 % Glucose angekeimt. Daraus wurden zu verschiedenen Ankeimungszeiten aliquote Teile abgezweigt und - wie in Abb. 4 angegeben - deren GTS II-Aktivität ermittelt.

Nach einer dreistündigen Ankeimung der Konidienpopulation wurde der überwiegende Rest der Zellen nach Aufteilung in drei Subkulturen auf einem Filter gewaschen. Die Zellen der ersten Subkultur a wurden in neuem Glucosemedium (1 %), die Zellen der zweiten Subkultur b in Glucose-freiem Medium und die Zellen der dritten Subkultur c in Glycerin-haltigem Medium (2 %) resuspendiert. Diese dritte Subkultur wurde dem Experiment beigelegt, um die Substratspezifität der GTS II-Regulation zu demonstrieren. Nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen in diesen drei Nachbehandlungsmedien wurden aliquote Teile der Zellen der drei Subkulturen entnommen und deren GTS II-Aktivität ermittelt.

In Teil A der Abb. 5 wurden die Aufnahmeraten der gesamten Zellpopulation in Abhängigkeit von ihrer Ankeimungszeit in 1 % Glucose aufgetragen.

In Teil B der Abb. 5 wurden die Aufnahmeraten der Zellen der drei unterschiedlichen Subkulturen in Abhängigkeit von der Nachbehandlungszeit in den unterschiedlichen Medien aufgetragen.

Es zeigt sich nun in Teil A der Abb. 5, daß die GTS II-Aktivität der Zellen während der Ankeimung trotz erheblicher Volumenvergrößerung durch Keimschlauchbildung und Zunahme des Proteingehaltes der Kultur um ca. 30 % geringfügig abnimmt. Dieser Befund wird im folgenden unter C.4 diskutiert.

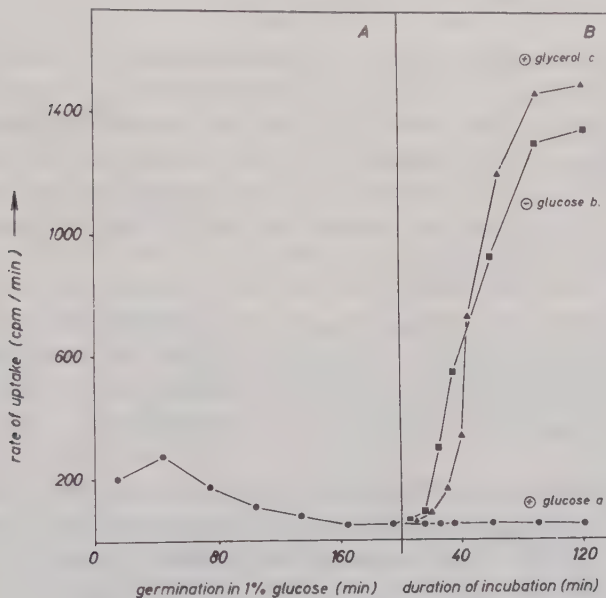


Abb. 5

Die Regulation des GTS II in Neurospora.

Teil A:  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahmeraten (cpm/min  $\times 2 \times 10^7$  Zellen) einer Konidienpopulation während einer 3stündigen Ankeimung in 1 % Glucose.

Teil B:  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahmeraten dreier Subkulturen während einer 2stündigen unterschiedlichen Nachbehandlung;  
 Kurve a: Subkultur a, in 1 % Glucose weitergekeimt;  
 Kurve b: Subkultur b, ausgehungert;  
 Kurve c: Subkultur c, in 2 % Glycerin weitergekeimt.

In Teil B der Abb. 5 ist zu sehen, daß die Subkultur a, deren Zellen in der Nachbehandlung in Glucose weitergekeimt worden waren, trotz weiterer Volumenzunahme der Zellen durch Keimschlauchwachstum gleichbleibend niedrige Aufnahmeraten während der Nachbehandlung aufweist (75 cpm/min).

Die Subkultur b, deren Zellen in der Nachbehandlung jedoch in Glucose-freiem Medium resuspendiert worden waren, zeigt nach einer Anfangsphase von ca. 15 Minuten mit geringer Steigerung der Transportraten einen drastischen und raschen Anstieg der Aktivität des GTS II bis ca. 90 Minuten Aushungerung, danach nur mehr eine geringfügige Zunahme bis 120 Minuten Aushungerung (Transportrate = 1 500 cpm/min).

Die Subkultur c, deren Zellen während der Nachbehandlung in Glycerin-haltigem Medium weitergekeimt wurden, zeigt wie die Subkultur b, deren Zellen ausgehungert worden waren, eine ebenso starke und rasche Steigerung der GTS II-Aktivität.

Aus diesen Befunden wird klar, daß angekeimte Neurospora-Zellen auf eine Verarmung ihrer Umwelt an Glucose innerhalb von 120 Minuten bei den hier gewählten Versuchsbedingungen mit einer etwa 20fachen Steigerung der Transportrate des hoch-affinen Glucose-Transport-Systems (GTS II) antworten.

Diese regulative Antwort, deren Mechanismus in C.3 und C.4 anhand entsprechender Experimente dargestellt werden wird, ist substratspezifisch, das heißt, eine Weiterkeimung glucoseangekeimter Zellen in glycerinhaltigem Medium führt nicht, wie eine Weiterkeimung der Zellen in Glucose, zu gleichbleibend minimalen Glucosetransportraten, sondern vielmehr ebenso wie Glucoseentzug von angekeimten Zellen zu einer raschen und starken Aktivitätssteigerung des GTS II. Dem naheliegenden Einwand, Glycerin könne von Neurospora nicht aufgenommen oder nicht in den Stoffwechsel eingeschleust werden, könne eine Aushungerung der Zellen also nicht verhindern, begegnet der in Abb. 6 dargestellte Vergleich der Atmungsintensität der drei in Abb. 5 bezüglich ihrer Glucosetransportraten geprüften Subkulturen.

In Abb. 6 ist die Abnahme der Sauerstoffsättigung ( $\Delta\%$ /Minute) halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Nachbehandlungszeit der drei Subkulturen in unterschiedlichem Medium dargestellt.

Drei Stunden in 1 % Glucose angekeimte und dann in 1 % Glucose weitergekeimte Zellen der Subkultur a zeigen eine exponentielle Zunahme des Sauerstoffverbrauches in der Nachbehandlungszeit, die durch eine Verdopplungszeit von 83 Minuten gekennzeichnet ist. Aus der Streuung der Werte in diesem Versuch errechnet sich der Standard-Schätzfehler dieser durch Regressionsanalyse ermittelten Abschätzung von 11,3 Minuten. Zellen der Subkultur b, die nach der Ankeimung ausgehungert wurden, zeigen keine Zunahme, vielmehr eher eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches. Zellen der Subkultur c, die nach der Ankeimung jedoch in 2 % Glycerin weiterinkubiert wurden, zeigen sogleich nach Umsetzen auf diese neue Kohlenstoffquelle einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches von etwa der Hälfte der Glucose-weitergekeimten Subkultur. Die Verdopplungszeit beträgt hier etwa 133 Minuten, der Standard-Schätzfehler dieser Abschätzung läßt sich auf 14,1 Minuten berechnen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt man beim Vergleich der Wachstumsraten (mg Trockengewicht/t) von Glucose- bzw. Glycerin-angekeimten Konidien. Auch hier zeigt eine Glycerin-angekeimte Subkultur eine etwa halb so schnelle Zunahme des Trockengewichtes wie eine entsprechende Glucose-angekeimte Subkultur (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 b).

Aus diesen Befunden wird also klar, daß Glycerin von *Neurospora* sowohl aufgenommen als auch in den Stoffwechsel eingeschleust werden kann und zu einer Weiterkeimung Glucose-angekeimter Zellen tatsächlich, wie oben angenommen, Anlaß gibt.

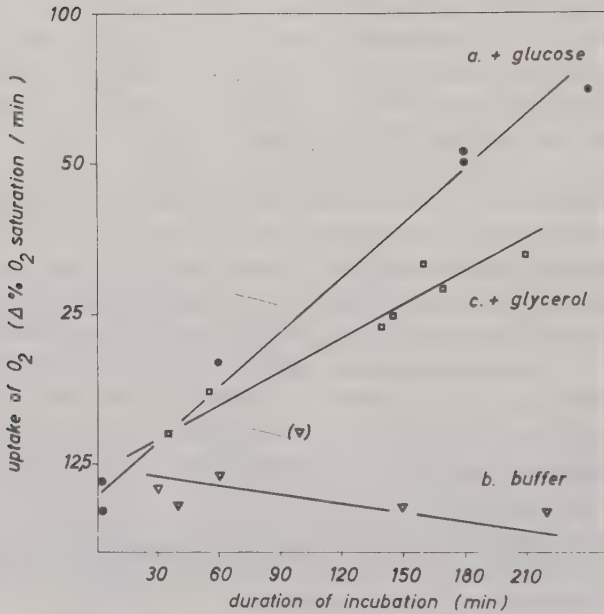


Abb. 6

Vergleich des Sauerstoffverbrauchs dreier Glucose-angekeimter Subkulturen nach unterschiedlicher Nachbehandlung.

Subkultur a: Aushungerung;

Subkultur b: Weiterkeimung in 2 % Glycerin;

Subkultur c: Weiterkeimung in 1 % Glucose;

Der Versuch zur Stimulierung der GTS II-Aktivität durch Umsetzen Glucose-angekeimter Zellen auf Glycerin-Medium, der bereits von anderen Autoren (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 b) beschrieben worden ist, wurde hier reproduziert, um die Substratspezifität der GTS II-Regulation zu demonstrieren. Die genannten Autoren fanden in weitergehenden Analysen, daß Wachstum von Neurospora auf Glucose, Fructose oder Sucrose zu einer minimalen Aktivität des GTS II führt, während Wachstum der Zellen auf Glycerin, Xylose, Casein-Hydrolysat oder Bacto-Trypton eine hohe Aktivität des GTS II bedingt. Diese Befunde werden unter C.15 als wichtiger Ansatzpunkt für weitere Versuche herangezogen.

3 Wirkung einer Aushungerung Glucose-angekeimter Zellen auf die Affinität ( $K_m$ ) und die maximale Transportrate ( $V_{max}$ ) des GTS II

Um der in Abb. 5 dargestellten Steigerung der Glucose-Transportraten von angekeimten Zellen während einer Aushungerung nachzugehen, wurden die enzymatischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  des GTS II vor und nach einer Aushungerung der Neurosporzellen ermittelt (Doxiadis, I., 1976). Es wäre denkbar, daß die Aushungerung der Neurosporzellen zu einer Affinitätsveränderung einer fest vorgegebenen, sich nicht ändernden Anzahl von Glucose-Carriermolekülen führt. Das vielleicht nur teilgesättigte Transportsystem nicht ausgehungelter Zellen würde während der Aushungerung durch eine  $K_m$ -Erniedrigung mehr und mehr mit dem Substrat abgesättigt, was zu einer Steigerung der Transportraten des Systems führen würde.

Zum anderen wäre es ebenso denkbar, daß die in Abb. 5 festgestellten Steigerungen der Glucose-Transportraten auf eine Bereitstellung weiterer aktiver Carriermoleküle während der Aushungerung bzw. der Glycerinweiterkeimung der Zellen zurückzuführen sind. Es wäre hierbei vorerst gleichgültig, ob, wie in C.1 diskutiert, diese neu hinzutretenden Carriermoleküle durch Nachlassen einer feedback-Hemmung auf Proteinebene aktiv werden könnten, oder ob sie von der Zelle neu synthetisiert würden.

In jedem Falle würde diese Erklärung der Transportratensteigerung eine Veränderung der maximalen Transportgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) der Zellen bedingen.

Aus Tabelle 2 (Werte von Doxiadis, I., 1976) ist zu ersehen, daß die Antwort der Glucose-angekeimten Zellen auf Glucose-entzug zweifacher Natur ist.

Einmal wird die Affinität des GTS II für das Substrat  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc durch die Aushungerung der Zellen um den Faktor 3 erhöht, die ausgehungerten Zellen erfassen also noch dreifach geringere Glucosekonzentrationen. Ob diese Affinitätsänderung durch Synthese neuer, höheraffiner Carriermoleküle oder durch Veränderung der Lipoproteinumwelt der schon in nichtausgehungen Zellen vorhandenen Carriermoleküle zu erklären ist, kann hier nicht entschieden werden. Diese Frage soll jedoch in der Diskussion im Zusammenhang mit der Besprechung von Befunden, die am Hexose-Transportsystem von Chlorella erhoben wurden, noch einmal aufgegriffen werden.

Zum anderen ist aus Tabelle 2 eine Steigerung der  $V_{\max}$  des GTS II während der Aushungerung der Zellen um den Faktor 5 zu ersehen. Daraus kann geschlossen werden, daß nach Aushungerung der angekeimten Zellen zusätzlich zur oben genannten Affinitätssteigerung fünfmal mehr Moleküle einer für die Glucose-Aufnahme Geschwindigkeits-bestimmenden Komponente als in nichtausgehungen Zellen vorliegen.

Ob diese GTS II-Komponente nun der eigentliche Glucose-Carrier ist, oder vielmehr etwa ein an der Energiezufuhr beteiligtes Molekül, soll unter C.6.1 diskutiert werden. Die weitere Frage, ob diese GTS II-Komponente durch Neusynthese oder etwa durch Befreiung von einer Substrat-Hemmung in ausgehungerten Zellen aktiv werden konnte, soll in C.4.1 erörtert werden.

Tabelle 2

| Ankeimungszeit | Aushungerungszeit | $K_m$          | $V_{max}$      |
|----------------|-------------------|----------------|----------------|
| min            | min               |                |                |
| 180            | 0                 | $92,3 \pm 9,8$ | $11,0 \pm 0,6$ |
| 180            | 90                | $37,7 \pm 0,3$ | $50,3 \pm 0,8$ |

Vergleich der 3-O-mglc-Affinität ( $K_m$ ,  $\mu M$ ) und der maximalen 3-O-mglc-Transportrate ( $V_{max}$ ,  $\mu g/min/mg$  Zellprotein) von Glucose-angekeimten nichtaushungerten und angekeimten und danach aushungerten Konidien.

4 Versuche zur Hemmung der Aushungerungs-bedingten  
Steigerung der GTS II-Aktivität durch Translations-  
und Transkriptionsgifte

Sollte das erste der unter C.1 vorgeschlagenen Regulationsmodelle, nämlich verringerte Substrathemmung des Carriers, für das GTS II zutreffen, so müßte man fordern, daß durch eine Aushungerung angekeimter Neurosporangien auch nach Blockierung der Proteinsynthese eine Steigerung der GTS II-Aktivität erreicht werden kann.

Umgekehrt müßte man erwarten, daß die gesteigerte Aktivität des GTS II angekeimter Neurosporangien durch Zugabe von Inhibitoren der Proteinsynthese wie CHX während der Aushungerung ausbleiben sollte, wenn das zweite unter C.1 vorgeschlagene Regulationsmodell für das GTS II, nämlich die Derepression eines oder mehrerer für den Glucose-Transport verantwortlicher Gene zutreffen sollte. Die Translation neusynthetisierter GTS II-spezifischer m-RNA sollte durch CHX unterbunden werden.

Diese Überlegungen liegen den folgenden Experimenten zugrunde (z. T. modifiziert nach Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 c), die eine Entscheidung zwischen den beiden vorgeschlagenen

Regulationsmodellen ermöglichen sollen.

#### 4.1 Hemmung der Proteinsynthese von angekeimten Zellen während der Aushungerung

Im folgenden Experiment soll untersucht werden, welchen Effekt eine Hemmung der Proteinsynthese angekeimter Zellen während der Aushungerung auf die Aktivität des GTS II hat. Als Hemmstoff wurde Cycloheximid (CHX) verwandt, das bei Eukaryonten, speziell bei Pilzen, spezifisch den Ablauf der Proteinsynthese durch Blockierung der Aminoacyltransferase an der großen (60S) Untereinheit der Ribosomen hemmt (Träger, L., 1969).

Der in Abb. 7 wiedergegebene Versuch gliedert sich in drei Phasen: In den ersten drei Stunden (Teil A) wurde eine Konidien-sporen-Population in Glucose angekeimt und danach in drei Subkulturen aufgeteilt. Diese drei Subkulturen wurden in unterschiedlichen Medien resuspendiert (entweder ausgehungert a und b oder in neuem Glucose-Medium aufgenommen c) und danach 30 Minuten lang (Teil B) mit CHX inkubiert. Nach Auswaschen des CHX wurde 120 Minuten lang (Teil C) das Zeitmuster der Aktivitätsveränderungen des GTS II unter unterschiedlichen Nachbehandlungsbedingungen verfolgt.

In Abb. 7, Teil A, ist die Veränderung der Transportraten von ankeimenden Neurospora-Zellen in Abhängigkeit von der Ankeimungszeit in Glucose, in Teil C in Abhängigkeit von der Nachbehandlung in CHX-freiem Medium wiedergegeben, die einer 30minütigen Zwischenbehandlung in CHX folgt.

Kurve a in Abb. 7, Teil C, gibt das Zeitmuster der Steigerung der GTS II-Aktivität einer Subkultur a wieder, die nach einer 30minütigen Aushungerung in CHX und einer nachfolgenden Überführung der Zellen in CHX-freies, glucosehaltiges Medium zu beobachten ist.

Kurve c gibt die Werte einer analogen Subkultur c wieder, deren Zellen jedoch während der CHX-Behandlung nicht ausgehungert, sondern in Glucose weitergekeimt worden waren.

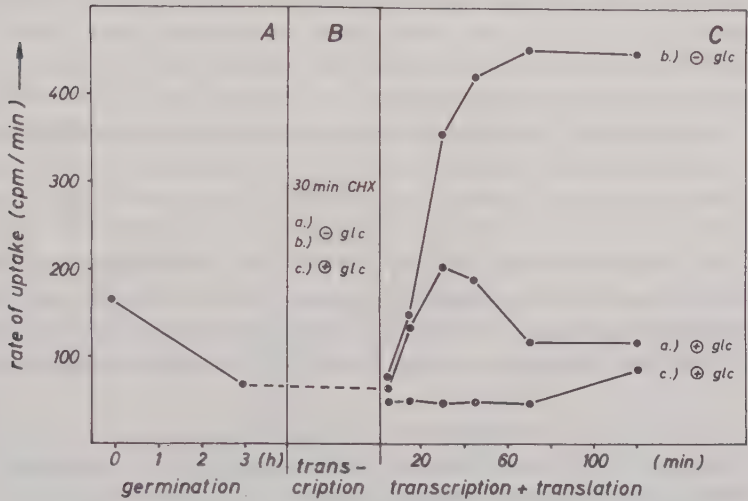


Abb. 7

GTS II-Aktivität von angekeimten Zellen nach Hemmung ihrer Proteinsynthese.

- Teil A: Glucose-Aufnahmeraten (cpm/min) einer Konidienpopulation während einer 3stündigen Ankeimung in 1 % Glucose;
- Teil B: Transkriptionsphase; 30minütige Inkubation dreier Subkulturen in Cycloheximid (CHX 4  $\mu$ g/ml); Subkultur a und b ausgehungert, Subkultur c in 1 % Glucose;
- Teil C: Transkriptions- und Translationsphase; Glucose-Aufnahmeraten (cpm/min) der drei Subkulturen während einer 2stündigen Nachbehandlungszeit in unterschiedlichen, CHX-freien Medien; Subkultur a und c in 1 % Glucose, Subkultur b ausgehungert.

Kurve b gibt Werte einer analogen Subkultur b wieder, deren Zellen in CHX ausgehungert worden waren und zusätzlich im Gegensatz zur Subkultur a danach auch in Glucose-freiem Medium weiter ausgehungert wurden.

Folgende Befunde sind aus Abb. 7 zu ersehen:

- a) Während der 3stündigen Ankeimung der Zellen nimmt deren Aufnahme- rate - wie schon in Abb. 5 dargestellt - ca. um die Hälfte ab.
- b) Die Transportraten sämtlicher drei Subkulturen a, b und c verändern sich während der 30minütigen Inkubation der Zellen in CHX nicht wesentlich, unbeschadet ob die Zellen hierbei ausgehungert oder in Glucose weitergekeimt wurden.
- c) Die Zellen der Subkultur c, die während der CHX-Behandlung und in der anschließenden Nachbehandlung in CHX-freiem Medium mit Glucose inkubiert worden waren, zeigen gleichbleibend niedrige Transportraten.
- d) Die Zellen der Subkultur a dagegen, die während der CHX-Behandlung ausgehungert worden waren, zeigen in der ersten Zeit der Nachbehandlung von 5 - 30 Minuten trotz Anwesenheit von 1 % Glucose eine 2 - 3fache Steigerung der Transportraten.
- e) In der nachfolgenden Zeit von 40 bis 100 Minuten kommt es in der Subkultur a wieder zu einer Abnahme der Transportraten.
- f) Die Zellen der Subkultur b, die sowohl während der CHX-Behandlung, als auch während der Nachbehandlung in CHX-freiem Medium ausgehungert worden waren, zeigen in den ersten 50 Minuten einen Anstieg der Transportraten um den Faktor 4 bis 5 und danach eine Einstellung auf ein Plateau.

Zu welchen Aussagen führt die Konfrontation dieser Befunde mit den in C.1 vorgeschlagenen alternativen Modellen zur Regulation der GTS II-Aktivität?

Der Befund b), daß bei einer Aushungerung der Zellen in CHX die Transportraten unverändert bleiben, läßt sich schwerlich in Einklang bringen mit einem Regulationsmodell wie dem der Substrat- oder feedback-Hemmung auf Proteinebene, das keinerlei Neusynthese beteiligter Komponenten vorsieht. Mit und ohne Hemmung der Ribosomen durch CHX sollte nach diesem Modell eine Aushungerung der Zellen zu einer Steigerung ihrer GTS II-Aktivität führen, welche jedoch nicht zu beobachten ist.

Gegen diese Argumentation könnte als Einwand vorgebracht werden, daß CHX möglicherweise den Glucose-Stoffwechsel stört. Die in CHX ausgehungerten Zellen könnten demnach die während der Ankeimung akkumulierte Glucose gar nicht verbrauchen. Das GTS II dieser Zellen würde so im Gegensatz zu den ohne CHX ausgehungerten Zellen nicht von der postulierten feedback-Hemmung befreit.

Zwei Befunde sollen im folgenden herangezogen werden, um den vorgetragenen Einwand wenn nicht zu entkräften, so doch zumindest unwahrscheinlich erscheinen zu lassen.

Bei Hefe konnte gezeigt werden, daß wohl eine gewisse Hemmung des Glucoseverbrauchs (30 - 40 %) zu verzeichnen ist, doch erst 20 Minuten nach Zugabe von CHX (Ferguson, J. J. et al., 1967). Wenn die nicht unwahrscheinliche Übertragbarkeit dieser Ergebnisse von Hefe auf Neurospora vorausgesetzt wird, kann ein nahezu ungestörter Verbrauch der Glucose in der hier angewandten 30minütigen Aushungerung in CHX-haltigem Medium erwartet werden. Selbst wenn der Glucoseverbrauch bei Neurospora anders als bei Hefe durch CHX wesentlich vermindert sein sollte, kann dies kein Grund für die gleichbleibend niedrigen Transportraten der Zellen während der 30minütigen CHX-Behandlung in Glucose-freiem Medium sein. Dafür soll als Beleg der von anderen Autoren (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 a) und von uns (Abb. 11 in C.6.1) beim GTS II beobachtete transstimulierte Gegentransport von Glucose angeführt werden. Hier, wie bei vielen anderen Transportsystemen, kann durch Vorbeladung der Zellen mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc die anschließende Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc stimuliert werden. Dieses unter C.6.1 eingehender dargestellte Experiment zeigt, daß im Zellinneren vor-

handene transständige unmarkierte 3-O-mglc-Moleküle unter den gewählten Bedingungen, also keineswegs durch feedback-Hemmung, den Eintritt markierter  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Moleküle von außen in die Zelle hemmen, sondern vielmehr stimulieren. Feedback-Hemmung des Carriers auf Protein-Ebene kann also kein Grund sein für die Hemmung der GTS II-Aktivität.

Aus dem Befund, daß sich die GTS II-Aktivität der in CHX-haltigem Medium ausgehungerten Subkulturen a und b in Abb. 7 im Gegensatz zu der in CHX-freiem Medium ausgehungerten Subkultur b in Abb. 5 nicht ändert, ist vielmehr der Schluß zu ziehen, daß eine Zugabe von CHX zu aushungernden Zellen offenbar die Neusynthese einer Geschwindigkeits-bestimmenden Komponente des GTS II verhindert. Diese Vorstellung stützt sich weiter auf den Befund d), daß es in der Subkultur a, die während der CHX-Behandlung ausgehungert worden war, trotz Anwesenheit des hemmenden Substrates Glucose, zu einer Steigerung der Transportraten kommt, nicht jedoch in der Subkultur c, die in der CHX-Zwischenbehandlung nicht ausgehungert worden war (Befund c). Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse übereinstimmend mit Schneider und Wiley (1971 c) folgendermaßen interpretieren: Während der 30minütigen Aushungerung in CHX kommt es in der Subkultur a zur Akkumulation von GTS II-spezifischer m-RNS, die in der Nachbehandlungszeit nach Auswaschen des CHX zur Translation gelangt. Der Vorgang der Translation ist im Gegensatz zum Vorgang der Transkription durch Anwesenheit des hemmenden Substrates Glucose nicht aufzuhalten.

Durch eine Verlängerung der Aushungerungszeit in CHX (= Phase B) kann offensichtlich die Akkumulation einer größeren Menge von GTS II-spezifischer m-RNS erreicht werden. Die in 30 Minuten CHX-Behandlung akkumulierte m-RNS führt nur zu einer zwei- bis dreifachen Steigerung der GTS II-Aktivität in der Phase C, während die in 50 Minuten CHX-Behandlung akkumulierte m-RNS eine fünffache Steigerung der GTS II-Aktivität in Phase C bewirkte.

Die oben genannten Befunde sprechen also dafür, daß die Aktivität des Glucose-Transport-Systems II von Neurospora auf der Ebene der Transkription gesteuert wird. Die Genexpression des GTS II wird in Zellen reprimiert, denen z. B. 1 % Glucose im Medium geboten wird.

Der Befund a), daß die Aufnahmezeiten der Zellen während der dreistündigen Ankeimung in 1 % Glucose trotz erheblicher Volumenvergrößerung ca. um die Hälfte abnehmen und der Befund e), daß die Transportraten der Subkultur a nach einem Anstieg bis zu 30 Minuten Nachbehandlungszeit wieder geringer werden und weiterhin der Befund f), daß Zellen einer analogen Subkultur jedoch während einer Glucose-freien Nachbehandlung keine vergleichbare Abnahme der Transportraten, sondern ein Plateau aufweisen, deutet auf einen weiteren Regulationsmodus des GTS II hin. Bereits andere Autoren (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 b) hatten diese irreversible Glucose-induzierte Abnahme der GTS II-Aktivität, die weit über den normalen turnover des Transportsystems hinausgeht, als Inaktivierung aktiver Transportproteine durch das Substrat Glucose beschrieben. Offensichtlich handelt es sich hier um ein weiteres Beispiel dafür, daß die Regulation von Enzymaktivitäten nicht nur durch Synthese-Repression ausgeübt wird, sondern auch durch chemische Modifikation von Enzymen zur Feinregulation. Der bekannteste Fall ist die unter C.5 erwähnte Regulation der Glycogen-Phosphorylase-Aktivität, die in Säugerzellen wie auch in Neurospora über einen katalysierten Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Zyklus gesteuert wird.

Die Inaktivierung des GTS II in Neurospora (60 Minuten = Halbwertszeit bei 25 °C bei 1 % Glucose) ist, wie schon erwähnt, offenbar irreversibel. Es konnte bisher keine CHX-insensible Reaktivierung des GTS II gefunden werden. Wir beobachten niemals eine Steigerung der Transportraten in CHX-gehaltenen ausgehungerten Zellen, auch wenn die Zellen vorher nur kurzfristig, also z. B. nur 60 Minuten inaktivierenden Bedingungen ausgesetzt waren.

Bei der Inaktivierung des GTS II bei Neurospora wird kein inaktivierendes Protein nach Glucose-Zugabe zu den Zellen induziert. Das sieht man daran, daß auch eine Überführung ausgehungelter Zellen in CHX-haltiges Glucose-Medium zu der gleichen Reduzierung der GTS II-Aktivität führt wie ein Umsetzen der Zellen in CHX-freies Glucose-Medium (Narayanan, K. et al., 1976 in Vorbereitung).

Bei der Feinregulation der ebenfalls durch Glucose-Repression und Glucose-Inaktivierung gesteuerten Malat-Dehydrogenase von Hefe unterbleibt im Gegensatz dazu die Glucose-induzierte Inaktivierung in CHX-haltigem Glucose-Medium. Hier scheint tatsächlich ein selbst wieder induzierbares Inaktivierungsprotein an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt zu sein (Ferguson, J. J., et al. 1967).

#### 4.2 Wirkung einer Rifampicin-Inkubation aushungernder Neurosporazellen auf deren GTS II-Aktivität

Zur Untermauerung des in 4.2 dargestellten Konzepts der Transkriptionsregulation des GTS II wären Experimente wünschenswert, bei denen durch Zugabe von Transkriptionsgiften während einer Aushungerung der Zellen die Derepression des GTS II verhindert werden sollte. Das bei Eukaryonten hierzu angewandte Actinomycin D kann bei Neurospora nur nach einer die Permeation der Zellen steigernden Vorbehandlung mit Tris-EDTA eingesetzt werden. Diese Prozedur beeinflusst jedoch die GTS II-Aktivität der Zellen und führt zu variablen Ergebnissen (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 a und b). Auch andere Transkriptions-Hemmstoffe wie Alpha-Amanitin und 5-Fluorouracil erwiesen sich bei Neurospora als wirkungslos (Marzluf, G. A., 1973). Im folgenden Experiment sollte deshalb einmal der Effekt einer Inkubation angekeimter Zellen mit Rifampicin während der Aushungerung auf die Aktivität des GTS II untersucht werden.

Das Antibiotikum Rifampicin hindert bei Prokaryonten die RNS-Polymerase an der Initiation der RNS-Synthese. Eine zur Aktivität notwendige Konformationsänderung des Enzymes wird durch das daran gebundene Rifampicin unmöglich gemacht (Hartmann, G. R., 1975).

Über die Wirksamkeit und Spezifität dieses Antibiotikums bei Eukaryonten herrscht einige Unsicherheit, die wohl teilweise auf die Instabilität des Reagens bei Inkubation mit Eukaryontenzellen zurückzuführen ist. So wachsen z. B. Neurosporazellen auf mit Rifampicin beschickten Platten nach einer Verzögerung gut an. In Einbauversuchen von radioaktivem Uridin in die RNS ganzer

Neurosporangien jedoch bewirkte Rifampicin während der ersten zwei Stunden Inkubation eine etwa 80 %ige Hemmung des Einbaus verglichen mit unbehandelten Zellen (Grosch, G., 1976). Wenn diese in Kurzzeitinkubationen (2 Stunden) mit Rifampicin beobachtete Hemmung des Uridineinbaues bei Neurospora durch eine Hemmung der RNS-Synthese bedingt ist, und wenn das in C.4 dargestellte Konzept der Transkriptionsregulation des GTS II zutrifft, so sollte eine Inkubation angekeimter Zellen mit Rifampicin während der Aushungerung die Derepression des GTS II verhindern. Dies zu prüfen schien sinnvoll, nachdem festgestellt war, daß durch Rifampicin die Translation von Neurosporangien nicht gestört wird und daß die GTS II-Aktivität bereits dereprimierter Zellen durch Rifampicin im Inkubationsgemisch nicht beeinträchtigt wird (unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei dem in Abb. 8 wiedergegebenen Versuch wurde eine Konidienpopulation 3 Stunden lang in Glucose angekeimt, danach gewaschen und in zwei Subkulturen aufgetrennt. Die eine Subkultur wurde nun ohne Rifampicin, die andere Subkultur nach Zugabe von 50 µg Rifampicin pro ml 120 Minuten lang ausgehungert. Während dieser Zeit wurden aliquote Teile beider Subkulturen abgezweigt, deren Glucose-Aufnahmeraten gemessen wurden. Wie aus Abb. 8 zu entnehmen ist, zeigen beide Subkulturen eine sehr ähnliche Zunahme der GTS II-Aktivität während der Aushungerung. Der Vergleich der Aktivitätsänderungen des GTS II in beiden unterschiedlich behandelten Subkulturen zeigt also, daß die aushungerungsinduzierte Steigerung der Transportraten von angekeimten Neurosporangien durch Zugabe von Rifampicin während der Aushungerung nicht zu unterbinden ist. Vor dem Hintergrund der zitierten 80 %igen Hemmung des Uridineinbaues in Neurospora durch Rifampicin (50 µg/ml) erscheint dieser Befund unerwartet.

Auf der anderen Seite zeigten jedoch in vitro-Messungen anderer Autoren, daß die aus Zellkernen von Neurospora isolierte r-RNS Polymerase I und die m-RNS-Polymerase II durch Rifampicin nicht zu hemmen sind (10 µg/ml) (Timberlake, W. E.; Turian, G., 1974). Im Lichte dieses Befundes scheint die beobachtete Insensibilität der Aushungerungs-induzierten Steigerung der GTS II-Aktivität gegenüber Rifampicin logisch. Die Ergebnisse des hier dargestellten Experimentes, die zitierten vitro-Mes-

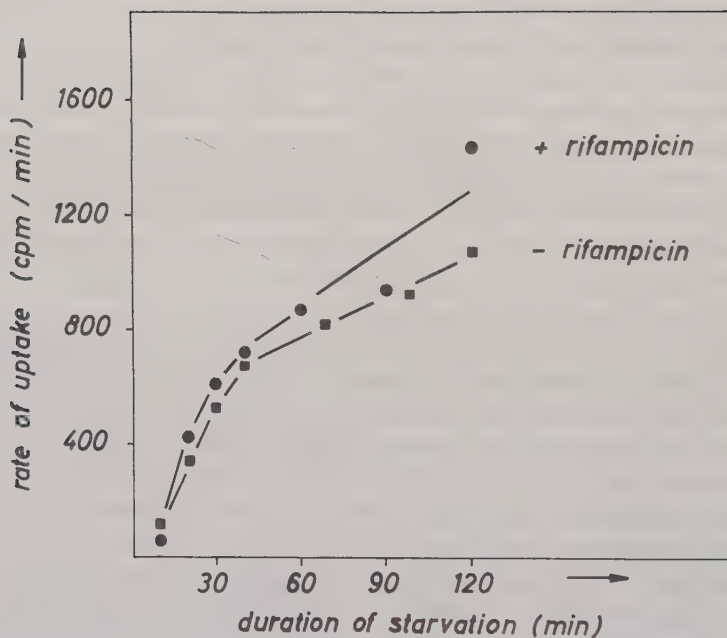


Abb. 8

Wirkung von Rifampicin auf die Ausprägung des GTS II in aushungernden Zellen.

$^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahmeraten (cpm/min/ $2 \times 10^7$  Zellen) einer mit Rifampicin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. einer ohne Rifampicin aushungernden Kultur.

sungen und alle weiteren bisher beschriebenen Beobachtungen (siehe hierzu: Wehrli, W.; Staehelin, M., 1975) legen den Schluß nahe, daß Rifampicin generell bei Eukaryonten und hier speziell bei *Neurospora* anders als bei Prokaryonten wie *E.coli* die m-RNS Synthese nicht hemmt. Eine etwaige andere Interpretation der Ergebnisse dieses Versuches auf Grund eines GTS II-Regulationsmodelles auf Translationsebene soll in der Diskussion dargestellt werden.

Der Widerspruch zwischen der in vivo-Hemmung des Uridineinbaus in *Neurospora* durch Rifampicin und der in vitro gefundenen Insensibilität der gewichtigsten RNS-Polymerasen I und II von *Neurospora* muß hier bestehen bleiben und kann wohl kaum durch den Hinweis auf die Rifampicin-sensible mitochondriale RNS-Polymerase III (Künzel, H.; Schäfer, K. P., 1971) aufgehoben werden.

#### 5 Wirkung von c-AMP auf die Regulation des GTS II

In den vorangegangenen Abschnitten C.1 bis C.4 war gezeigt worden, daß die Aktivität des hochaffinen Glucose-Transportsystems (GTS II) vom Glucoseangebot der Zellen gesteuert wird. Es war weiter dargestellt worden, daß die Repression des GTS II spezifisch nur von Glucose, dem Substrat des Transportsystems, ausgelöst werden kann, nicht jedoch von Glycerin, Xylose oder Fructose, Molekülen, die von *Neurospora* als Kohlenstoffquellen ebenso benützt werden können.

Daß für die Repression des GTS II nicht die extrazelluläre Glucosekonzentration entscheidend ist, sondern wohl allein die intrazelluläre Glucosekonzentration, konnte im folgenden Versuch wahrscheinlich gemacht werden. Hier sollte dem Mechanismus der Glucoserepression des GTS II weiter nachgegangen werden durch Zugabe des in vielen Systemen regulativ wirksamen Moleküls c-AMP zu angekeimten *Neurospora*-zellen.

Bei *E.coli* kann die Glucoserepression der im lac-Operon codierten  $\beta$ -Galactosidase durch Inkubation der Bakterienzellen in c-AMP-haltigem Medium aufgehoben werden. Die Transkription die-

ses Genes bzw. des lac-Operons gelingt dann in mit c-AMP-inkubierten Zellen trotz Anwesenheit von Glucose im Anzuchtmedium (Miller, J. H., 1972).

Bei Eukaryonten wie Hefe gibt es ebenso Anzeichen für eine mögliche Beteiligung von c-AMP an der Katabolit-Repression verschiedener Enzyme. Hier geht nach Zugabe von Glucose zum Zuchtmedium die Glucoserepression von Enzymen, die an der Zellatmung beteiligt sind, wie die Succinat-Dehydrogenase, mit einer Senkung des c-AMP-Spiegels (v. Wijk, R., 1971) einher (Fang, M.; Butow, R. A. 1970).

Bei Neurospora weiß man seit einigen Jahren, daß das c-AMP-synthetisierende, an die Zellmembran gebundene Enzym Adenylcyclase und c-AMP selbst auch in der Zelle zu finden sind (Flawia, M. M.; Torres, H. N., 1972). Diese Befunde ließen es sinnvoll erscheinen, nach einer eventuellen Beteiligung von c-AMP bei der Regulation (Glucose-Repression) des GTS II zu fragen.

Aus anderen Versuchen (Doxiadis, J. 1976) mit radioaktiv markiertem c-AMP konnte entnommen werden, daß c-AMP selbst von außen wohl nicht in die Neurospora-Zellen gelangen kann, entweder weil die Zellmembran dafür impermeabel ist, oder weil es noch vor Eintritt in die Zelle gespalten wird. Aus diesem Grunde wurde von uns das Derivat dibutyryl-c-AMP (db-c-AMP) eingesetzt, das in Säugerzellkulturen und anderen Systemen die gleiche biologische Wirksamkeit wie c-AMP zeigte, gegen enzymatischen Abbau jedoch unempfindlicher ist (Heidrick, M. L.; Ryan, W. L., 1971 und Michal, G. et al., 1971, Kaukel, E. et al., 1972).

In einem ersten Versuch sollte geprüft werden, ob eine Zugabe von db-c-AMP zu in Glucose angekeimten Zellen ebenso zu einer Derepression des GTS II führt, wie sie für die erwähnten Glucose-reprimierbaren Systeme bei E.coli und Saccharomyces cerevisiae zu beobachten war, oder ob zumindest die Derepression des GTS II während der Aushungerung durch Zugabe von db-c-AMP zu aushungernden Zellen verstärkt wird.

Dazu wurde eine Konidienpopulation 2 Stunden in Glucose angekeimt und danach in vier Subkulturen aufgeteilt. Zwei Subkulturen wurden, wie in Tabelle 3 angegeben, 60 Minuten weiter in

0,1 % Glucose angekeimt, einer Konzentration, bei der das GTS II eben noch reprimiert gehalten wird (Doxiadis, J., 1976). Der einen der beiden Subkulturen wurde hierbei zusätzlich  $3 \times 10^{-2}$  M db-c-AMP beigegeben. Die anderen beiden Subkulturen wurden 60 Minuten ausgehungert, wobei wiederum einer der beiden Subkulturen zusätzlich  $3 \times 10^{-2}$  M db-c-AMP beigegeben wurde. Danach wurden die Transportraten der vier unterschiedlich behandelten Subkulturen ermittelt.

Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, führt eine Behandlung ankeimender Konidien mit db-c-AMP nicht zu einer Steigerung der Transportraten des GTS II. Vielmehr hemmt die Zugabe von db-c-AMP zu aushungernden Zellen die üblicherweise zu beobachtende Steigerung der GTS II-Aktivität. Dieser Befund war nun mit den bisherigen bei E.coli und Saccharomyces gemachten Beobachtungen nicht in Einklang zu bringen.

Tabelle 3

| db-c-AMP während<br>der Weiterkeimung<br>bzw. während der<br>Aushungerung | Transportraten           |                             |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|                                                                           | nach 1 Std.<br>0,1 % glc | nach 1 Std.<br>Aushungerung |
| -                                                                         | 133                      | 313                         |
| +                                                                         | 112                      | 103                         |

Wirkung von db-c-AMP auf die Aktivität des GTS II (cpm/min) von angekeimten Zellen; Zugabe des db-c-AMP während einer 60minütigen Weiterkeimung in 0,1 % Glucose bzw. während einer 60minütigen Aushungerung.

Um die in Tabelle 3 angegebenen Ergebnisse abzusichern und um auszuschließen, daß die Hemmung der Derepression des GTS II als unspezifischer Effekt des in recht hoher Konzentration ( $3 \times 10^{-2} \text{M}$ ) eingesetzten zyklischen Nucleotides zu erklären sei, wurde der in Abb. 9 dargestellte Versuch unternommen. Hier sollte die Wirkung einer Zugabe von db-c-AMP sowie von nichtzyklischem 5'-AMP auf die GTS II-Aktivität von aushungernden Zellen innerhalb eines Zeitraumes von 90 Minuten untersucht werden. Dieses Experiment gliedert sich wie der in Abb. 5 wiedergegebene Versuch in zwei Teile, eine dreistündige Ankeimung einer Zellpopulation in 1 % Glucose (Teil A) und eine 90minütige Aushungerung (Teil B) dreier unterschiedlich behandelter, mit oder ohne db-c-AMP bzw. 5'-AMP inkubierter Subkulturen. Während dieser Aushungerungszeit wurden die Aktivitätsveränderungen des GTS II gemessen.

In das Aushungerungsmedium der Subkultur a, deren GTS II-Aktivität in Kurve a, Abb. 9, Teil B, dargestellt ist, wurde  $3 \times 10^{-2} \text{M}$  db-c-AMP beigegeben, die Subkultur b (siehe Kurve b) wurde ohne Zusätze ausgehungert, der Subkultur c (siehe Kurve c) dagegen wurde  $3 \times 10^{-2} \text{M}$  nichtzyklisches 5'-AMP in das Aushungerungsmedium beigegeben. Aus den gleichbleibend niedrigen Transportraten der Subkultur a ist zu ersehen, daß hier ebenso wie in dem in Tabelle 3 dargestellten Experiment die Zugabe von db-c-AMP zu aushungernden angekeimten Zellen deren Derepression im GTS II, wie sie z. B. in Subkultur b zu beobachten ist, vollkommen verhindert. Daß diese Hemmung der GTS II-Derepression ein spezifischer Effekt der zyklischen Nucleotides ist, zeigt der Anstieg der Kurve c, die die Transportraten der unter Zugabe von nichtzyklischem 5'-AMP ausgehungerten, im GTS II dereprimierbaren Zellen wiedergibt.

Die beobachtete Wirkung des db-c-AMP auf die Regulation des GTS II von Neurospora schien wie oben erwähnt im Lichte der zitierten Befunde bei E.coli, Saccharomyces und Neurospora zunächst unerwartet. Das Ergebnis wurde jedoch erklärbar durch Arbeiten von anderen Autoren (Tellez-Inon, M. T.; Torres, H. N., 1970), die zeigten, daß eine Zugabe von c-AMP zu gereinigten, aus Neurospora gewonnenen Präparationen des Enzymes Glycogen-Phosphorylase (E.C. 2.4.1.1.) die Aktivität dieses Enzymes ebenso stimuliert, wie das bei Präparationen aus z. B. Säugerzellen zu

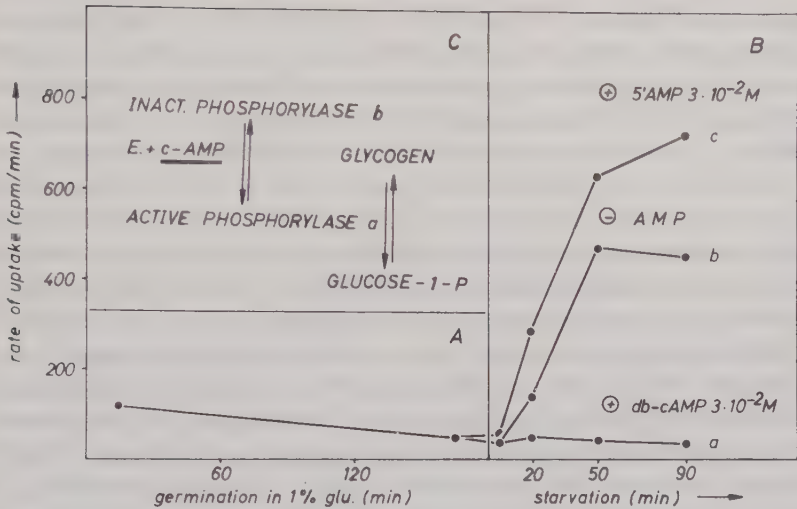


Abb. 9

Wirkung von db-c-AMP auf die Regulation des GTS II.

Teil A: Glucose-Aufnahmeraten (cpm/min) einer Konidienpopulation während einer 3stündigen Ankeimung in 1 % Glucose;

Teil B: Glucose-Aufnahmeraten (cpm/min) dreier unterschiedlich supplementierter Subkulturen während einer 90minütigen Aushungierung;

Subkultur a: +  $3 \times 10^{-2}$  db-c-AMP

Subkultur b: ohne Nukleotide

Subkultur c: +  $3 \times 10^{-2} M$  5'-AMP

Teil C: Einsatz: Hypothetischer Erklärungsvorschlag für die beobachtete db-c-AMP-bedingte Hemmung der Derepression des GTS II während einer Aushungierung der behandelten Zellen.

beobachten war. Hierdurch fand eine im folgenden dargelegte Erklärung der db-c-AMP-induzierten Hemmung der GTS II-Derepression eine starke Unterstützung.

Es wäre denkbar, daß wie im Einsatz zu Abb. 9 als Hypothese angegeben, dieses Enzym mit db-c-AMP ausgehungerten Zellen in seiner Aktivität soweit stimuliert wird, daß es durch Spaltung von Glycogen zu einer hohen, das GTS II reprimierenden Glucose- bzw. Glucose-1-P-Konzentration im Zellinneren führt.

Dieser Erklärungsvorschlag macht jedoch nur die unerwartete Hemmung der GTS II-Derepression während der Aushungierung in db-c-AMP klar. Als Hauptbefund dieses Experimentes gilt es daneben festzuhalten, daß c-AMP anders als im Falle von E.coli, wo es zu in Glucose gehaltenen Zellen zugesetzt die Glucoserepression der  $\beta$ -Galactosidase-Neusynthese durchbrechen konnte, hier bei Neurospora die Glucoserepression des hochaffinen Glucose-Transport-Systems jedoch nicht aufheben konnte. Es liegt nahe anzunehmen, daß der molekulare Mechanismus der Glucoserepression, der bei Bakterien für eine ganze Reihe Glucose-reprimierbarer Enzyme geklärt ist, im Falle des GTS II von Neurospora grundsätzlich anderer Natur ist.

#### 6 Versuche zur Aufklärung der Kopplung des aktiven Glucosetransportes mit dem Energiestoffwechsel der Neurospora-Zelle

Die Abhängigkeit der Aktivität des GTS II vom Energiestoffwechsel angekeimter und ausgehungelter Neurospora-Zellen war unter C.1 angesprochen worden. Im GTS II dereprimierte Zellen, die durch  $\text{NaN}_3$  in der oxydativen Phosphorylierung gehemmt wurden, deren ATP-Bildung in den Mitochondrien also unterbunden wurde, waren nur mehr zum raschen Ausgleich der 3-O-mglc-Konzentration zwischen Außen- und Innenmedium in der Lage. Ungehemmte Zellen dagegen zeigten schon nach 5,5 Minuten Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc bei Sättigung des GTS II (100  $\mu\text{M}$ ) eine ca. 600fache Akkumulation des Substrates im Zellinneren (siehe Abb. 4, Kurven c und b).

Von mehreren Autoren wurde untersucht, ob die GTS II-vermittelte Akkumulation der Zucker Sorbose und Glucose (bzw. 3-O-mglc) in Neurospora von einer chemischen Veränderung der Substrate (group translocation) begleitet ist wie dies z. B. bei dem in der Einleitung erwähnten PTS zu beobachten ist. Auch für Bäckerhefe wurde gezeigt, daß eine Akkumulation von z. B. 2-Desoxy-D-Glucose bei niedriger Substratkonzentration von einer Phosphokinase ermöglicht wird (v. Steveninck, J., 1968) (Bei hoher Substratkonzentration überwiegt bei der Hefe der Transport von Monosacchariden durch erleichterte Diffusion bis zum Konzentrationsausgleich.) Das Arbeitsprinzip von group translocation-Systemen beruht darauf, daß die im Zellinneren ankommenden Substratmoleküle aus dem chemischen Gleichgewicht entzogen werden (z. B. durch Phosphorylierung) und dadurch im Außenmedium stets eine höhere Substratkonzentration als im Zellinneren vorliegt. Diese gibt zum Carrier-vermittelten influx Anlaß. Ein solches Prinzip scheint beim GTS II von Neurospora nicht verwirklicht zu sein, da gefunden wurde, daß im Plasma von mit  $^{14}\text{C}$ -Sorbose bzw.  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-vorbeladenen Neurospora-Zellen nur die jeweiligen unveränderten Substrate vorliegen (Klingmüller, W.; Kaudewitz, F., 1966 und Scarborough, G. 1970 a). Bereits dieser Befund machte es unwahrscheinlich, daß die energieabhängige Akkumulation der Glucose durch das GTS II durch group translocation, etwa unter Beteiligung einer Phosphokinase abläuft. Anderenfalls sollte ein phosphoryliertes Zwischenprodukt wie im analogen Falle des Monosaccharidtransportes bei Hefe zu finden sein.

#### 6.1 GTS II-vermittelter Glucose-efflux und Glucose-Gegentransport

Wie bereits unter C.4.1 erwähnt, kann im Falle des GTS II von Neurospora Gegentransport nachgewiesen werden. Dies kann durch die gesteigerte (transstimulierte)  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Aufnahmerate von mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc-vorbeladenen Zellen demonstriert werden. Vorbeladene Zellen zeigen höhere Transportraten als vergleichbare nicht-vorbeladene Zellen (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 a). Weiterhin können mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc-vorbeladene Zellen, ganz im Gegensatz zu nicht-vorbeladenen Zellen, auch noch nach Inkubation mit Energiestoffwechselgiften gleichzeitig gebotene  $^{14}\text{C}$ -3-O-

mglc akkumulieren. Offensichtlich liefert der Substrat-efflux auf eine noch zu diskutierende Weise die für die Akkumulation nötige Energie.

Diese Befunde konnten als weiteres Argument dafür herangezogen werden, daß die GTS II-katalysierte Passage von Glucose bzw. 3-O-mglc durch die Zellmembran ohne chemische Veränderung des Substrates vor sich geht. Ein in der Zelle akkumuliertes, phosphoryliertes  $^{12}\text{C}$ -Substratmolekül könnte zum Eintritt des im Außenmedium gebotenen unphosphorylierten  $^{14}\text{C}$ -Substratmoleküles in die Zelle (Austauschtransport) keinen Anlaß geben, da beide Moleküle sich chemisch unterscheiden. Darum zeigen auch group translocation Transportsysteme wie das bakterielle PTS-System bis auf wenige Ausnahmen keinen Gegentransport.

Im folgenden sollen eigene Experimente zum GTS II-vermittelten efflux und zum Gegentransport von 3-O-mglc unter Einsatz verschiedener Energiestoffwechselgifte dargestellt werden. Die Kinetik des vom GTS II katalysierten 3-O-mglc-efflux und des Gegentransportes von Zellen, deren Energiestoffwechsel durch spezifische Hemmstoffe blockiert ist, soll Aufschluß über die Frage geben, ob im GTS II dereprimierte Zellen wirklich mehr Glucose-Carriermoleküle besitzen als reprimierte Zellen. Der unter C.3 zitierte Befund der fünffach höheren  $V_{\max}$  von dereprimierten Zellen, der an aktiv akkumulierenden Zellen erhoben worden war, soll hier an Hemmstoff-behandelten Zellen überprüft werden. Dazu wurden angekeimte, im GTS II reprimierte Zellen (Subkultur a) bzw. angekeimte und nach B.7.2 im GTS II dereprimierte Zellen (Subkultur b) bis zu 60 Minuten lang mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc vorbeladen. Dies geschah bei beiden Subkulturen in CHX-haltigem Medium, um im Falle der reprimierten Subkultur a eine Derepression während der Vorbeladung zu verhindern. Nach unterschiedlichen Vorbeladungszeiten wurden Teile der Subkulturen a und b in Energiestoffwechselhemmstoff-haltiges Medium überführt und die efflux-Rate von 3-O-mglc ermittelt.

In Abb. 10 (Teil A: reprimierte Zellen, Teil B: dereprimierte Zellen) ist die Aufnahme des Substrates in die Zellen der Subkulturen a und b während der Vorbeladung und die rasche Abgabe des Substrates in das Medium nach Zugabe von Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ,

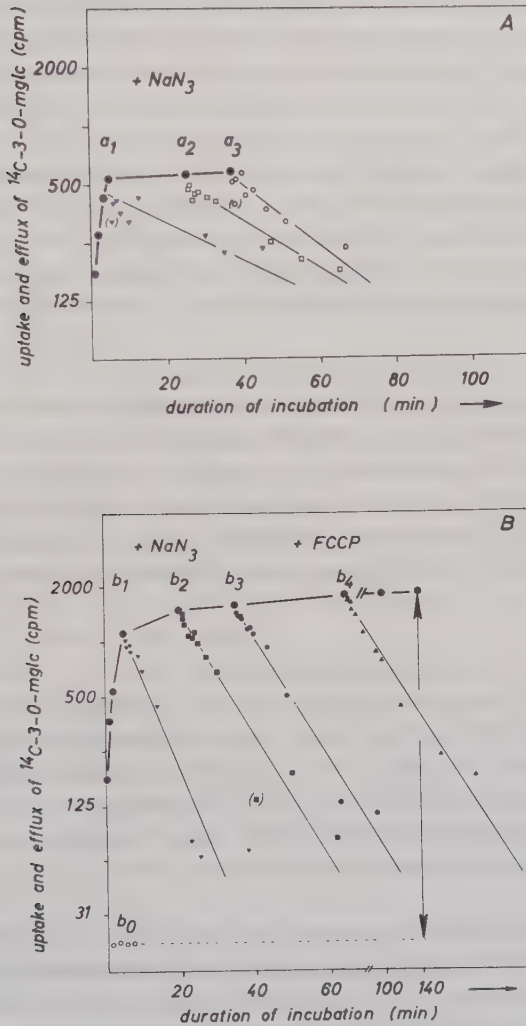


Abb. 10 Bestimmung der 3-O-mglic-efflux-Rate aus angekeimten und vorbeladenen Zellen

Teil A: Vorbeladung von im GTS II reprimierten Zellen mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic ( $10^{-4}$  M) und efflux des Substrates nach Zugabe von  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-2}$  M) nach unterschiedlichen Vorbeladungszeiten (Subkultur  $a_1 - a_3$ );

Teil B: Vorbeladung von im GTS II dereprimierten Zellen mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglic ( $10^{-5}$  M) und efflux des Substrates nach Zugabe von  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-2}$  M) nach unterschiedlichen Vorbeladungszeiten (Subkultur  $b_1 - b_3$ ) bzw. nach Zugabe von FCCP ( $5 \times 10^{-6}$  M); Subkultur  $b_0$ : Vorbeladungs in Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-2}$  M).

$10^{-2}$  M, Subkulturen  $a_1 - a_3$  und  $b_1 - b_3$ ) bzw. nach Zugabe von Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP,  $50 \times 10^{-6}$  M, Subkultur  $b_4$ ) wiedergegeben. Für die dereprimierten Zellen läßt sich im steady state unter den hier gewählten Bedingungen (GTS II 1/10 gesättigt) ein Anreicherungsfaktor des Substrates in den Zellen gegenüber dem Außenmedium von 140 errechnen. Dieser Faktor ergibt sich, wenn man den Konzentrationsausgleichswert der Subkultur  $b_0$ , die von Anfang an in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-haltigem und mit  $\text{NaN}_3$  versetztem Medium inkubiert wurde, mit der nach 135 Minuten Vorbeladung in den Zellen der Subkultur b gemessenen Radioaktivität vergleicht.

Bei den im GTS II reprimierten Subkulturen  $a_1 - a_3$ , die jeweils verschiedene Zeiten lang mit 3-O-mglc vorbeladen wurden, führt eine Zugabe von  $\text{NaN}_3$  zu einem Substratausstrom, der durch eine Halbwertszeit von 24,5 Minuten gekennzeichnet ist (Teil A der Abb. 10). Aus der Streuung der Werte der drei unabhängigen efflux-Ansätze läßt sich der Standardschätzfehler der durch Regressionsanalyse ermittelten Halbwertszeitabschätzung auf 4,66 Minuten berechnen.

Bei den im GTS II dereprimierten Subkulturen  $b_1 - b_3$ , die jeweils verschiedene Zeiten lang mit 3-O-mglc vorbeladen wurden, führt eine Zugabe von  $\text{NaN}_3$  zu einem dreifach rascheren Substratausstrom, der durch eine Halbwertszeit von 7,5 Minuten gekennzeichnet ist. Aus der Streuung der drei unabhängigen efflux-Ansätze läßt sich hier der Standardschätzfehler dieser Halbwertszeitabschätzung auf 4,72 Minuten errechnen.

Der Unterschied der Halbwertszeiten von reprimierten und dereprimierten Zellen ist hoch signifikant. Im durchgeführten t-Test errechnet sich unter Einsatz der beiden Halbwertszeiten samt ihrer Varianzen und der jeweiligen Freiheitsgrade ein t-Wert von 14,42. Bereits bei  $t = 2,66$  (1 % Irrtumswahrscheinlichkeit vorausgesetzt) wäre ein Unterschied signifikant.

$\text{NaN}_3$ , ein Hemmstoff der oxydativen Phosphorylierung und FCCP, ein Entkoppler, der eine drastische Steigerung der Protonen-Permeabilität biologischer Membranen bewirkt, führen bei den dereprimierten Zellen der Subkulturen  $b_1 - b_3$  bzw.  $b_4$  beide zu

gleichen efflux-Kinetiken. Die Halbwertszeit des 3-O-mglc-efflux der Subkultur b<sub>4</sub> nach FCCP-Zugabe beträgt 9,5 Minuten. Aus der Streuung der Werte dieses einen Ansatzes läßt sich der Standardschätzfehler dieser Abschätzung auf 3,4 Minuten errechnen.

Die Halbwertszeiten des 3-O-mglc-efflux aus dereprimierten Zellen nach NaN<sub>3</sub>- bzw. FCCP-Zugabe lassen sich im t-Test statistisch nicht voneinander unterscheiden, es errechnet sich ein t-Wert von 1,26. Erst bei einem Wert von 2,01 wäre jedoch (5 % Irrtumswahrscheinlichkeit vorausgesetzt) ein Unterschied signifikant.

Der Nachweis von Gegentransport, also von efflux-bedingter, scheinbarer Substratakkumulation, soll im folgenden in dem in Abb. 11 dargestellten Experiment geführt werden. Hier wurden angekeimte, im GTS II dereprimierte Zellen 30 Minuten lang mit <sup>12</sup>C-3-O-mglc (10 mM) vorbeladen. Zwei Subkulturen (c und d) dieser vorbeladenen Zellen wurden danach in <sup>14</sup>C-3-O-mglc-haltiges Medium überführt, dem jeweils unterschiedliche Energiestoffwechselgifte beigegeben waren.

Als Kontrollen dienten in diesem Versuch die Subkulturen a und b. Subkultur a enthielt im GTS II reprimierte, mit <sup>12</sup>C-3-O-mglc in GHX-haltigem Medium vorbeladene Zellen. Subkultur b enthielt im GTS II dereprimierte, jedoch nicht vorbeladene Zellen. Beide Subkulturen wurden nach Überführen in NaN<sub>3</sub>-haltiges und mit <sup>14</sup>C-3-O-mglc versetztes Medium auf Gegentransport hin geprüft.

Bei der durch die Kurve a repräsentierten, reprimierten und vorbeladenen Subkultur a ist während der untersuchten Inkubationszeit von 5,5 Minuten keine Zunahme der Radioaktivität in den Zellen festzustellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben anderer Autoren überein (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 a). Gegentransport mit vorbeladenen Zellen konnte immer nur bei Kulturen gefunden werden, die im GTS II dereprimiert waren, nie jedoch bei reprimierten Zellen.

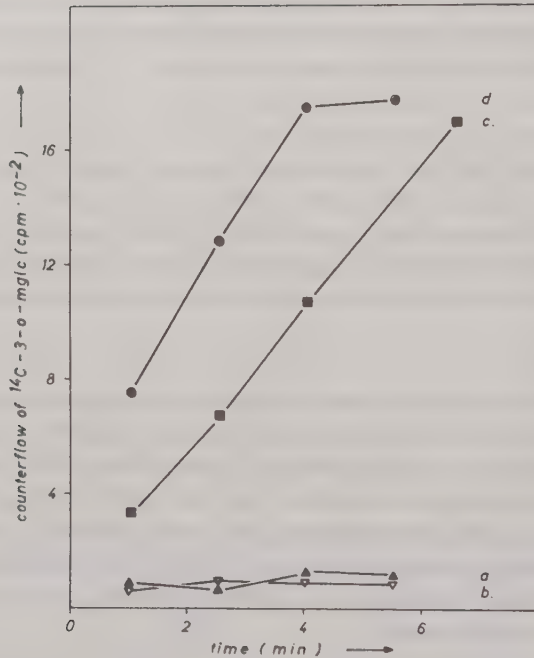


Abb. 11

Messung des  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Gegentransportes angekeimter und mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc vorbeladener Zellen.

- Vorbeladung: 60minütige Inkubation in CHX-haltigem (4 µg/ml) und mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc ( $10^{-2}$  M) versetztem Puffer;
- Test auf Gegentransport: Inkubation in  $\text{NaN}_3$ -haltigem ( $10^{-2}$  M) bzw. FCCP-haltigem ( $5 \times 10^{-6}$  M) und mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc ( $10^{-4}$  M) versetztem Puffer;
- Subkultur a: im GTS II reprimierte, vorbeladene Zellen in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc +  $\text{NaN}_3$ ;
- Subkultur b: im GTS II dereprimierte, nicht vorbeladene Zellen in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc +  $\text{NaN}_3$ ;
- Subkultur c: im GTS II dereprimierte, vorbeladene Zellen in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc +  $\text{NaN}_3$ ;
- Subkultur d: im GTS II dereprimierte, vorbeladene Zellen in  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc + FCCP.

Dieser Befund kann nun darauf zurückzuführen sein, daß reprimierte Zellen, denen das hochaffine GTS II weitgehend fehlt, nicht im selben Maße mit dem  $^{12}\text{C}$ -Substrat vorbeladen sind wie dereprimierte Zellen. Dieser Einwand kann nicht ganz ausgeräumt werden, ihm sollte jedoch schon im Versuchsaufbau begegnet werden durch die Wahl einer hohen Konzentration von 3-O-mglc (10 mM), bei der auch das niederaffine GTS I ( $K_m = 23 \text{ mM}$ ) noch zur Vorbeladung der Zellen mit beitragen kann.

Eine andere Deutung für den Verlauf der Kurve a wäre, daß reprimierte Zellen aufgrund ihrer nur sehr geringfügigen Ausstattung mit hochaffinem GTS II (eine Restaktivität an GTS II war auch bei reprimierten Zellen in Abb. 4, Kurve a zu erkennen) weder zur Ausschleusung von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc noch zur Einschleusung von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc in nennenswertem Umfang in der Lage sind. Für diese Annahme spricht der in Abb. 10 dargestellte Befund, daß nach Zugabe von  $\text{NaN}_3$  zu reprimierten Zellen, diese Zellen die vorher akkumulierte  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc mit einer dreifach geringeren efflux-Rate in das Außenmedium abgeben als die dereprimierten Zellen.

Bei der durch Kurve b, Abb. 11, repräsentierten dereprimierten, jedoch nicht vorbeladenen Subkultur b ist während der untersuchten Inkubationszeit keine Zunahme der Radioaktivität in den Zellen festzustellen (siehe hierzu auch Abb. 4, Kurve c, Daten einer identisch behandelten Subkultur). Die Zellen der Subkultur b sind nur mehr zum raschen, hier nicht mehr aufgelösten, Ausgleich des 3-O-mglc-Konzentrationsunterschiedes zwischen Außenmedium und Zellinnerem in der Lage. Die in den Zellen gefundene Radioaktivität gibt also den Konzentrations-Ausgleichswert an. Alle darüber hinausgehenden Werte der übrigen Subkulturen sind also als Anreicherung des  $^{14}\text{C}$ -Substrates im Zellinneren gegenüber dem Außenmedium anzusehen.

In Kurve c, Abb. 11, sind Werte der vorbeladenen, dereprimierten Subkultur c dargestellt. Diese Subkultur zeigt nach Überführen in  $\text{NaN}_3$ -haltiges, mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-versetztes Medium während der untersuchten Inkubationszeit eine Zunahme der in den Zellen nachweisbaren Radioaktivität über den durch die Kurven a und b gegebenen Konzentrations-Ausgleichswert reprimierter bzw. nicht

vorbeladener Zellen hinaus. Diese Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc in den Zellen in Gegenwart von  $\text{NaN}_3$  kann als Austauschtransport (counterflow) gedeutet werden, bei dem auf eine noch zu diskutierende Weise der Ausstrom von unmarkiertem Substrat den Einstrom von markiertem Substrat bedingt.

Aus Abb. 10 war zu entnehmen, daß eine Zugabe von FCCP zu Neurospora-Zellen ebenso wie eine Zugabe von  $\text{NaN}_3$  zu einem sofortigen Verlust des im Zellinneren angehäuften  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc führt. Bei dem Hexosetransportsystem von Chlorella führt eine Inkubation vorbeladener Algenzellen mit FCCP im Gegensatz zu einer Inkubation mit  $\text{NaN}_3$  weder zum efflux noch zum Gegentransport von Hexosen (Komor, E. et al., 1972). Dieser Befund wurde von den Autoren als wichtige Stütze für ein molekulares Modell der Energetik des Hexosetransportes unter steady-state-Bedingungen herangezogen, was in der Diskussion noch besprochen wird. Um zu prüfen, ob FCCP bei Neurospora zum GTS II-vermittelten Gegentransport von 3-O-mglc Anlaß gibt, wurde einer Subkultur d an Stelle von  $\text{NaN}_3$  FCCP im Inkubationsgemisch beigegeben.

In Kurve d, Abb. 11, sind Werte der dereprimierten, vorbeladenen Subkultur d wiedergegeben. Auch hier ist während der Inkubation in FCCP-haltigem und mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc versetztem Medium eine Zunahme der in den Zellen nachweisbaren Radioaktivität über den Konzentrationsausgleichswert hinaus zu erkennen. Im Gegensatz zu dem beim Hexosetransportsystem von Chlorella erhobenen Befund führt hier beim GTS II von Neurospora also eine Inkubation von vorbeladenen Zellen in FCCP zu Substrat-efflux (Abb. 10) und zum Gegentransport (Abb. 11).

Zur Energetik des Gegentransportes ist zu sagen, daß diese scheinbare Akkumulation von Substrat auch bei nicht-aktiven, also nur der erleichterten Diffusion dienenden Transportsystemen, wie z. B. dem Glucose-Transportsystem roter Blutkörperchen, zu beobachten ist. Auch das GTS II von  $\text{NaN}_3$ -behandelten Zellen ist als ein derartiges, die erleichterte Diffusion der Glucose katalysierendes Transportsystem anzusehen. Die im Gegentransport-Experiment zu beobachtende Anreicherung der  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc

ist eine Konsequenz der unter C.1 aufgeführten Gleichung (4), die den Netto-flux durch die Zellmembran als Differenz des jeweiligen influx und des jeweiligen efflux beschreibt. Tatsächlich überwiegt nach Überführen von dereprimierten und mit  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc vorbeladenen Zellen in  $\text{NaN}_3$ -haltiges und mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc versetztes Medium bei weitem der efflux des  $^{12}\text{C}$ -Substrates. Die hierbei zu messende scheinbare Akkumulation des  $^{14}\text{C}$ -Substrates im Zellinneren kann am besten verständlich gemacht werden, wenn man die  $^{12}\text{C}$ - und  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Moleküle als zwei verschiedene Substrate ansieht, die um ein- und denselben Carrier kompetitiv konkurrieren. Dann wird klar, daß die Einstellung eines Konzentrationsausgleichswertes nach passivem influx von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc durch einen entsprechenden efflux von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc hier in der ersten Zeit des Experimentes nicht zu erwarten ist, da in den mit 10 mM  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc vorbeladenen Zellen sämtliche in der Membran nach dem Außenmedium hin diffundierende Carrier durch  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc besetzt sind. Die scheinbare Substratakkumulation in  $\text{NaN}_3$ -behandelten Zellen, hier also die Anreicherung von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Molekülen, ist auf die kompetitive Hemmung des  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-efflux durch  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc-Moleküle zurückzuführen.

Die in Abb. 10 und Abb. 11 dargestellten Experimente sollen vor allem zeigen, daß auch vom Energiestoffwechsel der Zelle unabhängige Vorgänge wie Glucose-efflux und Glucose-Gegentransport in weit stärkerem Maße bzw. überhaupt nur in dereprimierten Zellen und nicht in reprimierten Zellen zu beobachten sind. Diese Befunde können als wichtige Argumentationshilfe dafür genommen werden, daß die im GTS II dereprimierten Zellen tatsächlich mehr aktive Glucose-Carrier besitzen als reprimierte Zellen. Die hier dargestellten Ergebnisse können die Annahme, daß in aushungernen Zellen nicht der Carrier selbst, sondern ein für den Energieinput verantwortliches Protein dereprimiert wird, nicht unterstützen. Andernfalls sollten sich dereprimierte Zellen nach Hemmung ihres Energiestoffwechsels im efflux und Gegentransport nicht von reprimierten Zellen unterscheiden.

## 6.2 Die chemiosmotische Hypothese des Aktiven Transportes

Zur Erklärung der Carrier-vermittelten Substratanreicherung in Zellen von Mikroorganismen wurde von Mitchell (Mitchell, P., 1967) eine Abwandlung der chemiosmotischen Hypothese über die Energiegewinnung in den Mitochondrien vorgebracht. Der Autor vertritt mit anderen die Auffassung, daß die zur Akkumulation der verschiedensten Substrate in der Zelle nötige Energie aus der Ladungs- und Potentialdifferenz über der Zellmembran, speziell aus einem Protonengradienten bezogen wird. Der Carrier soll nach der chemiosmotischen Hypothese des Aktiven Transportes die Einschleusung eines Substratmoleküles zusammen mit einem Proton bewerkstelligen (Protonen-Symport), wobei das Substrat in der Zelle auf Kosten des Membranpotentials und des Protonengradienten angehäuft wird. Der zur Akkumulation und Aufrechterhaltung der intrazellulären Substratkonzentrationen nötige Energiepool (Protonengradient und Membranpotential = protonmotive force) soll laufend durch den Energiestoffwechsel der Zelle wieder aufgefüllt werden. Experimentelle Befunde, die diese Hypothese stützen, stammen u. a. von Prokaryontensystemen wie z. B. dem  $\beta$ -Galactosid-Transportsystem bei *E. coli* (West, O. C.; Mitchell, P., 1973) und von Eukaryontensystemen wie z. B. dem Hexose-Transportsystem bei *Chlorella vulgaris* (Komor, E., 1973), oder dem hochaffinen Glucose-Transport-System GTS II von *Neurospora crassa* (Slayman, C. L.; Slayman, C. W., 1974).

Wie bei *Chlorella* ist auch bei *Neurospora* nach Zugabe von Glucosederivaten wie 3-O-mglc eine Alkalisierung des Außenmediums nachweisbar. Dieser zuerst von anderen erhobene Befund (Slayman, C. L.; Slayman, C. W., 1974) ließ sich in eigenen Experimenten reproduzieren. Abb. 12, Teil A zeigt  $p_H$ -Messungen des Außenmediums von angekeimten *Neurospora*-Zellen nach Zugabe von 3-O-mglc. Man sieht, daß reprimierte, eben von Glucose freigewaschene Zellen auf Zugabe von 2 mM 3-O-mglc nur eine recht geringe Antwort zeigen. Sie fahren fort mit nahezu gleicher Rate durch Abgabe von  $CO_2$  das Außenmedium anzusäuern (Ordinate:  $p_H$ , Abszisse: Inkubationszeit in Minuten). Dereprimierte ausgehungerte Zellen dagegen, mit ihrem in der Aktivität stark gesteigerten GTS II, zeigen nach Zugabe von 3-O-mglc eine rasche Alkalisierung des Außenmediums, was als Verbrauch von Protonen während des

Einwärtstransportes der 3-O-mg1c (Protonen-Symport) bzw. Hydroxylionen-Gegentransport gedeutet werden kann.

In Abb. 12, Teil B ist ein schematisches Modell für Protonen-getriebene aktive Transportsysteme in biologischen Membranen dargestellt. Es gibt eine Reihe von Befunden (siehe Diskussion), die die Annahme begründen, daß eine Zellmembran-gebundene ATPase für den Aufbau des Protonengradienten zwischen Außenmedium und Zellinnerem verantwortlich ist. Die bei der Spaltung von ATP freigesetzten Protonen sollen von der ATPase vektorie11 gerichtet vor der Zellmembran angereichert werden. Nach ihrer Verbindung mit dem Carrier-Substrat-Komplex sollen sie diesen entsprechend dem chemiosmotischen Konzentrationsgefälle des Protonengradienten bzw. entsprechend dem Membranpotential in das Zellinnere dirigieren. Weiter soll der Carrier im sauren Außenmedium eher in einer protonierten, hochaffinen Form und im alkalischen Zellinneren eher in einer unprotonierten, niederaffinen Form vorliegen. Diese postulierten, pH-gesteuerten Affinitätsveränderungen, die beim Hexosetransportsystem von Chlorella (Komor, E.; Tanner, W., 1974) und dem  $\text{PO}_4^{---}$ -Transport-System von Neurospora tatsächlich auch gefunden wurden (Lowendorf, H. S. et al., 1974), sollen die Abdissoziation des Substrates im Zellinneren erleichtern. Die einfache unter C.1 aufgeführte Gleichung (4) würde hier zur Beschreibung des jeweiligen Nettoflux durch die Membran nicht mehr ausreichen, da hier der  $K_m$ -Wert des Systems auf der Membraninnenseite, durch die Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels bedingt, höher ist als auf der Membranaußenseite.

Nach dem Protonen-Symport-Modell soll die Substratanreicherung im Zellinneren also einmal auf der Diffusion des entsprechend dem elektrochemischen Gradienten in der Membran sich bewegendem Carrier-Substrat-Protonen-Komplexes und zum anderen auf der pH-gesteuerten Affinitätssteigerung des Carriers im Außenmedium beruhen.

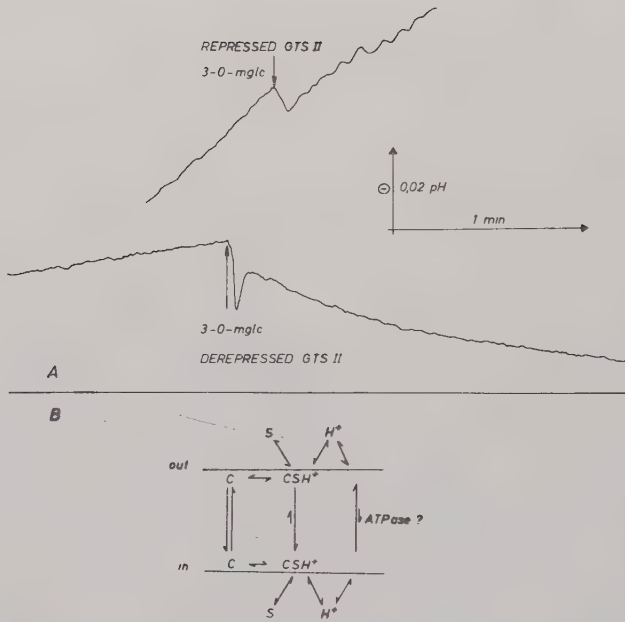


Abb. 12

- Teil A: pH-Messung des Außenmediums von angekeimten Zellen ( $8 \times 10^7$  Zellen/ml in ungepuffertem  $\text{H}_2\text{O}$ ) nach Zugabe von 3-O-mglc (2 mM).
- Obere Kurve: Nichtausgehungerte, im GTS II reprimierte Zellen;
- Untere Kurve: Zwei Stunden ausgehungerte, im GTS II dereprimierte Zellen;
- Teil B: Schematisches Modell für Protonen-getriebene aktive Transportsysteme in biologischen Membranen.

7      Messung des Glucose- und des Galactose-Transportes  
verschiedener Sorbose-resistenter Mutanten von  
Neurospora

Zur Abklärung von Befunden, die in späteren Kapiteln näher erörtert werden sollen (C.13 - C.16), wäre der Einsatz von GTS II-Defektmutanten angezeigt. In jüngster Zeit wurde eine Mutante mit um 50 % reduzierter GTS I-Aktivität, jedoch unverändert hoher GTS II-Transportrate beschrieben (Halaban, R., 1975). Diese Mutante eignet sich zu dem gewünschten Zweck also nicht. Erfolgversprechender hierfür erschienen einige der Mutanten, die als resistent gegen den für Neurospora toxischen Zucker Sorbose selektiert worden waren. Diese  $\text{sor}^{\text{r}}$ -Mutanten, die durch Kreuzungen und Komplementationstests sechs Genorten zugeordnet werden konnten (Klingmüller, W., 1967 b und c), weisen zum Teil einen gegenüber dem Wildtyp verringerten Sorbosetransport auf. Sorbose gelangt ebenso wie Glucose über das GTS II in die Zellen, was durch Koinduktion des Glucose- und des Sorbosetransportes bei Aushungerung der Zellen und durch kompetitive Hemmung der Glucoseaufnahme bei Zugabe von Sorbose (oder vice versa) gezeigt werden kann.

In eigenen Versuchen wurden nun verschiedene  $\text{sor}^{\text{r}}$ -Mutanten entsprechend B.7 sowohl nach einer Ankeimung, als auch nach einer zusätzlichen Aushungerung auf ihre GTS II-Aktivität hin untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Bei dem Vergleich der Transportraten war zu berücksichtigen, daß die einzelnen  $\text{sor}^{\text{r}}$ -Mutanten eine vom Wildtyp abweichende Zellgröße besitzen. Um eine Normierung zu ermöglichen, wurde bei diesen Versuchen der Proteinwert der einzelnen Stämme nach Zellaufschluß ermittelt und die jeweiligen Transportraten bezogen auf 1 mg Protein angegeben. In Tabelle 4 sind Daten mehrerer Versuche zusammengestellt. Wie zu sehen ist, unterscheiden sich die Transportraten der drei Stämme im Glucose-reprimierten Zustand nach Ankeimung ohne nachfolgende Aushungerung nicht wesentlich. Der t-Test liefert für den Vergleich Wt-10/ $\text{sor}^{\text{r}}$ -A 3 einen t-Wert von 2,84 und für den Vergleich Wt-10/ $\text{sor}^{\text{r}}$ -A 10 einen t-Wert von 1,79. Beide Werte liegen deutlich unter der bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschranke von  $t = 4,60$ . Die Unterschiede sind also nicht signifikant.

Wie weiter zu sehen ist, unterscheiden sich dagegen nach einer zusätzlichen Aushungerung von 90 Minuten die Transportraten der drei angekeimten Stämme. Der Mittelwert der Aktivität der Mutante  $\text{sor}^{\text{r}}\text{-A 3}$  liegt etwa um  $1/4$  tiefer, der Mittelwert der Mutante  $\text{sor}^{\text{r}}\text{-A 10}$  sogar etwa um die Hälfte tiefer als beim Wildtyp. Der t-Test liefert für den Vergleich  $\text{Wt-10/sor}^{\text{r}}\text{-A 3}$  einen t-Wert von 5,39 und für den Vergleich  $\text{Wt-10/sor}^{\text{r}}\text{-A 10}$  einen t-Wert von 10,88. Beide Werte liegen deutlich über der bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschranke von  $t = 4,60$ , die Unterschiede in der GTS II-Aktivität der drei Stämme sind also signifikant. Die übrigen untersuchten  $\text{sor}^{\text{r}}$ -Mutanten zeigten keine signifikanten Glucose-Transport-Minderungen oder erwiesen sich wegen morphologischer Defekte und geringer Vitalität ( $\text{sor}^{\text{r}}\text{-A 1}$ ,  $\text{sor}^{\text{r}}\text{-C 17}$ ) als ungünstig für weitere Versuche.

Eine Mutante ( $\text{sor}^{\text{r}} 6$ ) fiel nicht durch niedrige, sondern vielmehr durch hohe Transportraten speziell nach der 3stündigen Ankeimung auf. Bei diesem Stamm, der in ungekeimtem und in dereprimiertem Zustand etwa die gleichen Transportraten wie der Wildtyp aufwies, war während der Ankeimung in Glucose niemals eine Abnahme der Aktivität zu beobachten, wie sie für den Wildtyp unter C.4.1 dargestellt worden war, sondern vielmehr eine Steigerung der Transportraten. Wenn man die Aktivität von ungekeimten Konidien mit der Aktivität von angekeimten Konidien vergleicht, so beträgt der Quotient beider Raten beim Wildtyp 2,23, bei der Mutante  $\text{sor}^{\text{r}} 6$  dagegen 0,62. Der Unterschied zwischen den Quotienten von Wildtyp und Mutante ist signifikant. Der berechnete t-Wert von 7,14 liegt deutlich höher als die hier bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültige Signifikanzschranke von  $t = 3,17$ .

Aus diesem Befund kann die Annahme abgeleitet werden, daß die Mutation  $\text{sor}^{\text{r}} 6$  die Glucoserepression der Transkription betrifft, da Zellen dieses Stammes im Gegensatz zum Wildtyp auch in Glucose-haltigem Medium noch GTS II bilden. Die alternative Annahme, daß in dieser Mutante der Mechanismus der Glucose-induzierten irreversiblen Inaktivierung des GTS II verändert sei, scheint nicht zuzutreffen. Die Halbwertszeiten der GTS II-Inaktivierung von dereprimierten Wildtyp- und Mutanten-Zellen unterschieden sich nicht wesentlich. (Eigene unveröffentlichte Beobachtungen.)

Tabelle 4

|              | Wt-10        | sor <sup>r</sup> -A 3 | sor <sup>r</sup> -A 10 |
|--------------|--------------|-----------------------|------------------------|
| O Minuten    | 782 ± 82     | 1 207 ± 124           | 976 ± 16               |
| Aushungerung |              |                       |                        |
| 90 Minuten   | 10 435 ± 381 | 7 491 ± 389           | 5 176 ± 296            |
| Aushungerung |              |                       |                        |

Messung der <sup>14</sup>C-3-O-mglc-Transportraten (cpm/min x mgZellprotein) von Wildtyp und zwei im sor<sup>r</sup>-A-Gen mutierten Sorbose-resistenten Mutanten nach einer 3stündigen Ankeimung der Zellen in 1 % Glucose (= 0 Minuten Aushungerung) bzw. nach einer zusätzlichen 90minütigen Aushungerung. Mittelwerte und Mutungsgrenzen berechnet aus Daten dreier unabhängiger Versuche.

Zur Klärung der Frage, ob das sor<sup>r</sup>-A-Gen eine Komponente des GTS II kodiert, wurde die Aktivität des Galactose-Transport-Systems beim Wildtyp und der Mutante sor<sup>r</sup>-A 3 untersucht. Galactose vermag nicht wie z. B. Sorbose den Glucose-Transport kompetitiv zu hemmen (Schneider, R. P.; Wiley, W. P., 1971 a). Das heißt, daß Galactose im Gegensatz zu Sorbose von einem anderen Transportsystem als dem GTS II in die Neurospora-Zelle eingeschleust wird.

In Tabelle 5 werden die K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Werte des Galactose-Transport-Systems der Mutante und des Wildtyps miteinander verglichen. Der Unterschied der K<sub>m</sub>-Werte ist auf Grund der hohen Fehler-schwankungen nicht als signifikant zu bezeichnen. Nach Regressionsanalyse der im Lineweaver Burk plot aufgetragenen Meßpunkte wurde der t-Wert für die inversen K<sub>m</sub>-Werte berechnet. Er liegt mit t = 1,08 niedriger als die bei 1 % bzw. 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschranken von t = 2,79 bzw. t = 2,06.

Die durch Regressionsanalyse ermittelte Abschätzung der maximalen Galactose-Transportrate der Mutante sor<sup>r</sup>-A 3 ist um den Faktor 5 niedriger als beim Wildtyp. Der gemessene Unterschied zwischen den inversen V<sub>max</sub>-Werten von Wildtyp und Mutante ist

trotz der hohen Streuung der Meßwerte noch als signifikant zu bezeichnen. Der berechnete t-Wert von  $t = 3,16$  für diesen Unterschied liegt höher als die hier bei 1 % bzw. 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschranken von  $t = 2,79$  bzw.  $t = 2,06$ .

Der Befund, daß eine Mutation des  $\text{sor}^r$ -A-Gens sowohl das hochaffine Glucose-Transport-System (Tab. 4), als auch das davon unabhängige Galactose-Transport-System (Tab. 5) beeinträchtigt, läßt es nicht länger gerechtfertigt erscheinen, die Sorbose-resistenten A-Gen-Mutanten als GTS II-spezifische Defekt-Mutanten anzusehen. Vielmehr wäre denkbar, daß der bei diesen Stämmen beobachtete pleiotrope Defekt in unterschiedlichen Transport-Systemen durch eine Veränderung der Zellmembran oder indirekt durch einen gestörten Zellwandaufbau zu erklären wäre. Für diese Deutung spricht die Beobachtung, daß zwei unmittelbar bzw. mittelbar an der Zellwand- und der Zellmembransynthese beteiligte Polysaccharid-Synthetasen, die Glucan- und die Glycogen-Synthetase, in Neurospora von Sorbose gehemmt werden (Tatum, E. L., 1973 und Mishra, N. C.; Tatum, E. L., 1972). Die beiden Enzyme könnten im Zuge einer Mutation zur Sorbose-Unempfindlichkeit in den  $\text{sor}^r$ -Mutanten als Nebeneffekte die genannten pleiotropen Aktivitätsverminderungen verschiedener Transport-Systeme und die bei den  $\text{sor}^r$ -Mutanten beobachteten, mehr oder weniger starken morphologischen Defekte mitbedingen.

Tabelle 5

|                                           | Wt-10                | $\text{sor}^r$ -A 3 |
|-------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| $K_m$<br>( $10^{-4}$ M)                   | $4,38 \pm 1,81$      | $2,66 \pm 0,68$     |
| $V_{\max}$<br>(cpm/min/mg<br>Zellprotein) | $17\,438 \pm 7\,248$ | $3\,399 \pm 883$    |

Bestimmung der Affinität ( $K_m$ ) und der maximalen Transportrate ( $V_{\max}$ ) des Galactose-Transport-Systems beim Wildtyp und der Mutante  $\text{sor}^r$ -A 3. Mittelwerte und Mutungsgrenzen berechnet aus Daten von 14 (Wt-10) bzw. 12 ( $\text{sor}^r$ -A 3) unabhängigen Messungen.

## Teil II    Versuche zur Markierung und Isolierung der dereprimierbaren Komponente des GTS II

Im Teil I der vorliegenden Arbeit wurden biochemische Charakteristiken des GTS II wie etwa seine hohe Affinität, die verschiedenen Aspekte der Regulation seiner Aktivität und zuletzt Experimente über seine Energieversorgung dargestellt. Im Teil II der Arbeit sollen aufbauend auf den Ergebnissen des ersten Teiles Versuche zur Isolierung von Komponenten des GTS II beschrieben werden. Hierbei wurde vor allem die Plasmamembran von *Neurospora* auf Komponenten des GTS II hin untersucht. Außerdem wurden Experimente mit den durch osmotischen Schock aus Zellwand und Zellmembran ganzer Zellen selektiv ablösbaren Proteinen durchgeführt. In dieser Zellfraktion wurden zuerst bei Bakterien (Neu, H. C.; Heppel, L. A., 1965), später auch bei Eukaryonten (Wiley, W. R., 1970 und Hack, A., 1974) Komponenten der verschiedensten Transportsysteme, sogenannte Bindeproteine, entdeckt.

### 8            Isolation von Plasmamembran-Vesikeln von *Neurospora*

Bei Versuchen zur Isolierung von Transport-Systemen besteht das Problem, die Komponenten des Systems vor dem Zellaufschluß so kenntlich zu machen, daß sie danach in den folgenden Reinigungsschritten noch nachweisbar sind. In-vitro-Messungen ihrer Aktivität, wie sie bei Enzymanreicherungen üblich sind, gelingen hier nicht, da die Transportfunktion des untersuchten Systems an eine intakte Zellmembran gebunden ist. Für die angestrebte selektive Markierung von Transport-Systemen bzw. von einzelnen Komponenten stehen heute dennoch eine Reihe von Methoden zur Verfügung, wie etwa die in der Einleitung erwähnte differentielle Doppelmarkierung dereprimierbarer Proteine.

Zur Erhöhung der Sensibilität solcher Markierungsversuche schien es sinnvoll, eine Voranreicherung der gesuchten Komponenten durch die Isolierung der Plasmamembran von *Neurospora* anzustreben, in der integriert Transportsysteme wie das GTS II zu finden sein sollten.

### 8.1 Chemische Leitmerkmale von Plasmamembranen

Als Anreicherungskriterium für Plasmamembranen sind chemische Leitmerkmale, etwa Plasmamembran-spezifische Lipidmoleküle oder Kohlenhydrate bis heute nicht gefunden worden. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Membrantypen von Pilzen (Mitochondrien-, Vakuolen- und Plasmamembranen) haben jeweils nur graduelle Unterschiede im Gehalt der einzelnen Lipide oder Kohlenhydrate erbracht, die in ihrer Aussagekraft und Deutlichkeit jedoch nicht ausreichen, um als chemisches Leitmerkmal bei der Isolierung von Plasmamembranen herangezogen zu werden (Longley, R. P. et al., 1968 und Hallermayer, G.; Neupert, W., 1974 und Scarborough, G., 1975). Hingegen kann die selektive Markierung von Zellmembranproteinen mit nichtpermeablen Reagentien wie etwa Fluorescein-Isothiozyanat bzw. diazotierter <sup>35</sup>S-Sulfanilsäure eine geeignete Handhabe zur Anreicherung bieten. Bei der wandlosen *Neurospora*-Mutante *slime* konnte so eine selektive Markierung der Plasmamembran erreicht werden (Ono, B. J., 1972 und Scarborough, G., 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode nicht aufgegriffen, da dies den Ersatz der *slime*-Mutante oder enzymatisch hergestellter Protoplasten erfordert hätte, über deren GTS II-Aktivität nichts bekannt war. Eine Übertragbarkeit der unter C.1 bis C.4 dargestellten Grundlagen für Versuche zur Isolierung des GTS II vom Wildtyp auf die Mutante *slime* oder auf Protoplasten war nicht gesichert. Es erschien uns deshalb günstiger, das Plasmalemma nach Zellaufschluß und Zellfraktionierung wie im folgenden Abschnitt beschrieben mit Hilfe eines Leitenzyms anzusprechen und anzureichern.

### 8.2 Zellaufschluß und Zellfraktionierung angekeimter Neurosporazellen. Leitenzyme von Plasmamembranen

Die klassische Methode zur Reinheitsprüfung definierter Zellfraktionen ist die Messung bestimmter Leitenzymaktivitäten, die nur in dem untersuchten Zellkompartiment bzw. nur in einer bestimmten Zellstruktur, hier in der Plasmamembran, vorkommen.

Enzymatische Unterscheidungsmerkmale für die verschiedenen zellulären Membranen sind bekannt und Trennungsgänge für Plasmamembranen wurden bei Hefe und bei *Neurospora* beschrieben (Matile, Ph. et al., 1967, Fuhrmann, G. F. et al., 1974, Ono, B. I., 1972, Wiley, W. R., 1974 a, und Scarborough, G., 1975).

Die hier angewandte, bei mehreren Organismen bewährte Zellmembranpräparationsmethode nach Matile ist gekennzeichnet durch ein Aufsplittern des Plasmalemma in sehr kleine Membranvesikel während des Zellaufschlusses mit Glasperlen. Diese Zellmembranvesikel sind durch kurzzeitige Zentrifugationen von 2 000 bzw. 10 000 bzw. 40 000 g Beschleunigung, bei der Zellwände, Zellkerne und Mitochondrien schon sedimentieren, noch nicht fällbar, wohl aber durch eine einstündige Zentrifugation bei 150 000 g.

Zur Identifizierung von Zellfraktionen von *Neurospora* mit hohem Gehalt an Plasmamembranen wurde in der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivität einer  $Mg^{2+}$ -ATPase gemessen. Das Enzym, das in hochgereinigten Plasmamembranpräparationen bei Hefe (Matile, Ph. et al., 1967) und bei der Protoplasten-ähnlichen *Neurospora*-Mutante *slime* (Scarborough, G., 1975) als Zellmembran-Leitenzym bestätigt wurde, unterscheidet sich von der mitochondrialen, an der Energiekonservierung beteiligten  $Mg^{2+}$ -ATPase durch ihre Resistenz gegenüber dem Hemmstoff Oligomycin. Die mitochondriale ATPase ist bereits durch niedrige Konzentrationen von Oligomycin (10 µg/mg Enzymprotein) in ihrer Aktivität vollkommen zu hemmen.

Zur Abschätzung des Gehalts der Zellfraktionen an mitochondrialen Membranen wurde die spezifische Aktivität dieser Oligomycinsensiblen  $Mg^{2+}$ -ATPase und der ebenso in mitochondrialen Membranen integrierten Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (SDH) bestimmt. Mitochondriale Membranen sind bei *Neurospora* die wichtigste Membranklasse, die als Kontamination in Zellmembranpräparationen zu erwarten ist. Endoplasmatisches Retikulum findet sich sehr wenig in angekeimten *Neurospora*-Wildtyp-Zellen (Matile, Ph., pers. Mitteilung; siehe hierzu auch die EM-Bilder von *Neurospora*-Zellen bei Wiley, W. R., 1974 a).

Die Messung der SDH schien hier angebrachter als die Messung des  $O_2$ -Verbrauches (Fuhrmann, G. F. et al., 1974), die nur

mitochondriale Membranen mit intakter Atmungskette erfaßt. Die Messung der SDH ermöglicht auch die Abschätzung des Gehalts an submitochondrialen Membranen, die unter Umständen während der Präparation das wasserlösliche Cytochrom c verloren haben und deswegen die vollständige Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff nicht mehr zu katalysieren vermögen.

### 8.3 Verteilung der Aktivitäten von mitochondrialen und Zellmembran-Leitenzymen in verschiedenen Zellfraktionen

In Tabelle 6, Teil A ist der durch differentielle Zentrifugation vorgenommene Trennungsgang für die verschiedenen Zellfraktionen wiedergegeben. In Teil B dieser Tabelle ist die Zusammenfassung mehrerer Messungen der spezifischen Aktivität der zwei mitochondrialen Leitenzyme und des Zellmembran-Leitenzymes in den so erhaltenen Zellfraktionen dargestellt.

In Abschnitt B.10.1 und B.10.2 waren in Abb. 2 und Abb. 3 jeweils Beispiele von Aktivitätsmessungen dieser drei Leitenzyme angegeben worden.

Von einem Zellaufschluß zum anderen waren große Schwankungen in der getesteten spezifischen Aktivität der drei Leitenzyme zu verzeichnen. Die Gründe hierfür liegen wohl darin, daß der Aufschluß der Zellen trotz Standardisierung der Medien, Aufschlußzeiten und Zelltiter und trotz mikroskopischer Kontrolle des Aufschlußerfolges, in seiner Intensität dennoch nicht gänzlich reproduzierbar war. Weiterhin war zumindest im P 150 000 eine Proteaseaktivität zu beobachten (Halbierung der Proteinwertes der Präparation nach 7 Tagen bei 0 °C). Sie könnte zur Varianz der Meßwerte beigetragen haben.

Ähnlich starke Unterschiede in der Ausbeute an Zellmembran-ATPase wurden auch bei Versuchen publiziert, bei denen das Plasmalemma der Protoplasten-ähnlichen Mutante *slime* von *Neurospora* präpariert wurde (Scarborough, G., 1975).

Tabelle 6

| Rohaufschluß |  | 2.000 g   | 10.000 g   | 40.000 g   | 150.000 g   |
|--------------|--|-----------|------------|------------|-------------|
|              |  | → S 2 000 | → S 10 000 | → S 40 000 | → S 150 000 |
|              |  | 10 min.   | 10 min.    | 10 min.    | 60 min.     |
|              |  | ↓         | ↓          | ↓          | ↓           |
| Teil A       |  | P 2 000   | P 10 000   | P 40 000   | P 150 000   |

Teil B

SDH

nMole Cyt c

min x mg Prot.

|            |             |                         |            |           |
|------------|-------------|-------------------------|------------|-----------|
| 23,6 ± 0,7 | 83,9 ± 35,2 | 39,5<br>(Einzelmessung) | 14,5 ± 6,8 | 1,6 ± 0,5 |
|------------|-------------|-------------------------|------------|-----------|

Olig. sens. ATPase

nMole P<sub>i</sub>

min x mg Prot.

|            |             |            |            |           |
|------------|-------------|------------|------------|-----------|
| 51,0 ± 0,7 | 96,0 ± 25,5 | 45,5 ± 2,2 | 21,7 ± 8,8 | 0,0 ± 0,0 |
|------------|-------------|------------|------------|-----------|

Olig. res. ATPase

nMole P<sub>i</sub>

min x mg Prot.

|            |            |             |            |            |
|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 28,6 ± 3,6 | 10,7 ± 8,4 | 39,2 ± 11,2 | 59,4 ± 8,7 | 17,7 ± 1,7 |
|------------|------------|-------------|------------|------------|

Differentielle Zentrifugation des Mycel-Rohaufschlusses zur Isolation verschiedener Zellfraktionen von Neurospora (Teil A); Verteilung der Aktivitäten zweier mitochondrialer und eines Zellmembran-Leitenzymes in den Zellfraktionen (Teil B).

Als erste Zellfraktion wurde das P 2 000 des Rohaufschlusses (Zellwände u. a.) untersucht. In Tabell 6 ist zu sehen, daß die durch Oligomycin hemmbare mitochondriale ATPaseaktivität die Oligomycin-resistente Zellmembran-ATPaseaktivität übertrifft. Die mitochondriale SDH ist gut nachweisbar.

In der zweiten untersuchten Zellfraktion, dem P 10 000 des Überstandes der ersten Zentrifugation, welche hauptsächlich die Mitochondrien enthalten sollte, tritt dieses Überwiegen der mitochondrialen Leitenzyme noch stärker hervor, auch wenn in dieser Fraktion besonders starke Unterschiede der spezifischen Enzymaktivitäten von Präparation zu Präparation zu verzeichnen waren.

Im P 40 000 ist eine leichte Verschiebung dieses Verhältnisses zu Ungunsten der mitochondrialen Leitenzyme feststellbar, wenngleich die hohen spezifischen Aktivitäten von Oligomycin-sensibler ATPase und SDH noch auf einen starken Gehalt an submitochondrialen Membranen hinweisen.

Im P 150 000 kann im Zentrifugationsgang zum erstenmal eine Zellfraktion gewonnen werden, bei der die Aktivität der Oligomycin-resistenten ATPase diejenige der Oligomycin-sensiblen übersteigt. Nach wie vor ist in dieser Fraktion jedoch ein Gehalt an mitochondrialen Leitenzymen nachweisbar. Im einzelnen sind  $12,5 \pm 2,3$  % der Gesamtaktivität an SDH gegenüber  $51,9 \pm 2,2$  % der Gesamtaktivität der Membran-gebundenen Oligomycin-resistenten Zellmembran-ATPase der Zellen im P 150 000 nachweisbar.

Aus diesem Tatbestand ist zu schließen, daß während des kurzzeitigen Aufschlusses der Neurospora-Hyphen durch Glasperlen teilweise eine Schädigung der Mitochondrien und ein Aufsplittern ihrer Membranen in sehr kleine Vesikel erfolgte. Die das P 150 000 kontaminierenden mitochondrialen Membranvesikel können, wie unten gezeigt wird, im Sucrosegradienten weitgehend von den Membranvesikeln des Plasmalemmas abgetrennt werden.

Im Überstand nach 150 000 g Beschleunigung, der alle löslichen Proteine und Enzyme der Neurosporzellen enthält, ist die Oligomycin-sensible ATPase überhaupt nicht mehr nachweisbar, die

SDH nur mit sehr geringer spezifischer Aktivität. Dagegen ist eine Oligomycin-resistente ATPase nach wie vor messbar. Diese Aktivität könnte eine aus dem Plasmalemma abgelöste Zellmembran-ATPase darstellen, wie bei der Präparation des Hefe-Plasmalemma angenommen wurde (Matile, Ph., 1970). Andererseits könnte jedoch auch die in der Fraktion der löslichen Proteine beobachtete ATP-Spaltung durch Fermente des Zellstoffwechsels zu erklären sein.

Aus diesem Grunde schien es uns auch nicht gerechtfertigt, im Rohaufschluß der Zellen die Oligomycin-resistente  $Mg^{2+}$ -ATPase-Aktivität zu messen und von diesem Wert ausgehend Anreicherungsfaktoren für das Zellmembran-Leitenzym im Laufe der differentiellen Zentrifugation zu berechnen. Es wurde deshalb, wie in den vorangegangenen Abschnitten angegeben, allein die Anreicherung der Aktivität der membrangebundenen Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase als Maß für die Anreicherung von Zellmembranvesikeln benützt.

Aus dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten der drei Leitenzyme in den verschiedenen Zellfraktionen wird klar, daß nur das P 150 000, welches nach vorheriger Entfernung leicht sedimentierbarer Partikel nach 150 000 g Beschleunigung gewonnen werden kann, bei der hier angewandten Methodik gleichzeitig einen hohen Gehalt an Zellmembranen und einen niedrigen Gehalt an mitochondrialen Membranen besitzt.

Von einigen Autoren wird bezweifelt, daß die Oligomycin-resistente, Membran-gebundene ATPase wirklich als Zellmembran-Leitenzym angesprochen werden darf (Christensen, M. S.; Cirillo, V. P., 1972). Aus Mitochondrien in Lösung gegangene und dadurch Oligomycin-resistent gewordene ATPase soll mit nichtmitochondrialen Membranen wie dem endoplasmatischen Retikulum reassoziieren können. Diesem Einwand kann hier aber bei der angewandten Methodik des Zellaufschlusses und der Lagerung der Zellfraktionen bei 0 °C wegen der extremen Kälte-Labilität der löslichen mitochondrialen ATPase keine größere Bedeutung beigemessen werden. Um jedoch mehr Information über die hier als Zellmembran-Leitenzym angesehene ATPase von Neurospora zu erhalten, wurden die in den folgenden Abschnitten dargestellten Versuche zur weiteren Charakterisierung dieses Enzymes unternommen.

9 Charakterisierung der Oligomycin-resistenten ATPase durch ihre Membrangebundenheit, Ionenspezifität und durch ihr pH-Optimum

9.1 Gleichgewichtszentrifugation von Membranvesikeln des P 150 000 im Sucrosegradienten

In Anlehnung an eine bei Hefe erarbeitete Plasmalemma-Präparations-Methode wurde entsprechend B.9.3 eine Sucrosegradientenzentrifugation der nach differentieller Zentrifugation im P 150 000 sedimentierten Membranvesikel durchgeführt. Dadurch sollten einmal die Plasmamembranvesikel von der Kontamination mit mitochondrialen Vesikeln und anderen Mikrosomen befreit werden und zum anderen die erwähnten Einwände gegen die Deutung der  $Mg^{2+}$ -ATPase als Zellmembran-Leitenzym überprüft werden.

Abb. 13 zeigt das Verteilungsmuster der beiden getesteten Leitenzyme, der SDH und der Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase in einem Sucrosegradienten von 15 - 60 % (w/w) nach Gleichgewichtszentrifugation der aufgetragenen Membranen des P 150 000. An der Auftragsstelle (Fraktion 20) ist nur eine sehr geringe Aktivität dieser beiden Enzyme zu messen, sie sind also tatsächlich nach wie vor Membran-gebunden. Demnach ist aus mitochondrialen Membranvesikeln entweder keine Oligomycin-resistente ATPase in Lösung gegangen, oder dieses Enzym hat seine Aktivität auf Grund seiner Kälte-Labilität weitgehend eingebüßt.

Weiter geht aus Abb. 13 hervor, daß im Gradient eine Auftrennung zweier unterschiedlich schwerer Membransysteme erfolgt. Die durch die SDH gekennzeichneten mitochondrialen Membranen kommen bei  $42,2 \% \pm 1,4 \%$  w/w Sucrose ins Gleichgewicht, während die durch die Oligomycin-resistente  $Mg^{2+}$ -ATPase gekennzeichneten Plasmamembranvesikel bei  $30,7 \% \pm 1,9 \%$  w/w Sucrose ihre Schwimmdichte erreicht haben. Bei diesen durch vier unabhängige Membran-Präparationen und Gleichgewichtszentrifugationen ermittelten Sucrosekonzentrationen war jeweils die maximale Aktivität der beiden Leitenzyme zu finden (die angegebene Schwankung gibt den mittleren Fehler des Mittelwertes dieser Dichteabschätzung an, nicht die Breite der Banden im Gradienten, die etwa  $\pm 8 \%$  Sucrose betrug). Das Überlappen der Schwimm-

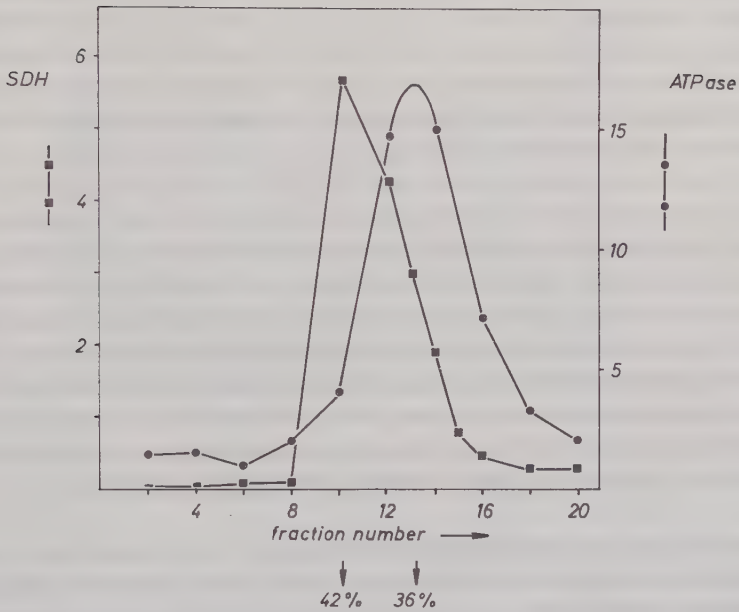


Abb. 13

Verteilung der Aktivitäten (relative Einheiten) von SDH (Mitochondrien-Membranen) und Oligomycin-resistenter ATPase (Zellmembranvesikel) im Sucrosegradienten

Gradient 15 - 60 % w/w; 12stündige Zentrifugation bei 100 000g; Proteineinsatz 10 - 30 mg vom P 150 000; Bedingungen der Enzymtests wie Abb. 2 und Abb. 3

dichtebereiche der beiden unterschiedlichen Membranvesikel bedingt also eine nur teilweise Abtrennung der mitochondrialen Vesikel von den Zellmembranvesikeln. Die Breite der beiden Banden rührt nicht von einer Überladung des Gradienten oder von ungenügender Zentrifugationsdauer her. Gradienten mit nur 10 mg Membranprotein Auftrag (anstelle der sonst üblichen 30 mg) sowie längere Zentrifugationszeiten von 17 Stunden (anstelle der sonst üblichen 12 Stunden) erbrachten dasselbe Bild. Eine Abflachung des Gradienten auf 20 - 55 % Sucrose führte ebenso wenig wie die Verwendung von Urografin, einem geringer viskosen Zentrifugationsmedium, zu einer verbesserten Auftrennung der beiden Leitenzym-Aktivitäten.

In der oberen Hälfte der Gradienten, die 64 % der aufgetragenen Oligomycin-resistenten ATPase-Aktivität des P 150 000 enthält, findet man z. B. noch 33 % der ursprünglichen SDH-Kontamination des P 150 000. Eine fast vollständige Eliminierung der SDH-Kontamination ist zu erreichen, wenn man entweder die obere Gradientenhälfte in einem neuen Gradienten rezentrifugiert, oder wenn man nur das obere Drittel des Gradienten poolt und dabei einen Verlust von mehr als der Hälfte der durch die ATPase gekennzeichneten Zellmembranvesikel in Kauf nimmt.

Der Befund, daß mitochondriale Membranen hier ebenso wie Zellmembranen eine derartig weite Streuung (ca.  $\pm$  8 % Sucrose) ihrer Gleichgewichtsdichte aufweisen, deutet auf inhomogene Membranpopulationen hin. Eine ebenso große Streuung der Schwimmdichte wurde für Zellmembranpräparationen von Neurospora beschrieben, die von anderen Autoren mit unterschiedlichen Techniken isoliert wurden (Wiley, W. R., 1974 a). Durch den Glasperlenaufschluß der Zellen bzw. das Resuspendieren des P 150 000 mit dem Potter entstanden wohl unterschiedlich große Membranvesikel bzw. Membranfragmente mit und ohne anhaftende Zellwandbestandteile. Derartige inhomogene Vesikelpopulationen werden bei der Präparation der verschiedenen zellulären Membranen öfters beschrieben (Hölzl-Wallach, D. F.; Knüfermann, H. G., 1973).

9.2      Elektronenoptische Abbildungen von Membranvesikeln  
der an Oligomycin-resistenter ATPase reichen Region  
im Sucrosegradienten

Zur weiteren Analyse der ATPase-reichen Region im Sucrose-Gradienten wurden die darin enthaltenen Membranen nach Verdünnen in Puffer und Sedimentation in der Ultrazentrifuge im Elektronenmikroskop untersucht.

In elektronenoptischen Bildern von Plasmamembranen kann mit Hilfe der hochauflösenden Technik der Gefrierätzung die charakteristische Oberflächenstruktur der Zellmembran demonstriert werden. Bei Hefe etwa erkennt man bei solchen Präparationen Inaginationen der Membran und Regionen mit hexagonaler Anordnung von Membranprotein-Partikeln (Matile, Ph. et al., 1967; Fuhrmann, G. G. et al., 1974). Der hohe methodische Aufwand der Gefrierätztechnik schien jedoch hier nicht gerechtfertigt. Deshalb wurden bei der Herstellung der EM-Bilder herkömmliche Fixierungs- und Schneidemethoden angewandt. Die Ausdeutungsmöglichkeit dieser Bilder ist jedoch begrenzt und kann nur unter Hinzuziehung zusätzlicher Eigenschaften der dargestellten Membranen, wie z. B. Leitenzymaktivitäten, vorgenommen werden.

In Abb. 14 a ist jeweils ein 28 200fach vergrößerter Überblick über die im ATPase-peak des Sucrose-Gradienten vorhandenen Strukturen wiedergegeben. Es ist eine relativ reine Population kleiner Membranvesikel zu erkennen, wie sie aufgrund der hier angewandten Zellaufschluß- und Zellfraktionierungsmethode zu erwarten waren. In Abb. 14 b ist ein 85 000fach vergrößerter Ausschnitt aus dieser Präparation zu sehen. Bei manchen Vesikeln (siehe Pfeil) tritt die unit-membrane-Struktur der geschnittenen Vesikel zutage.

Neben der Zellmembran und den Mitochondrien sind andere Membranstrukturen wie Vakuolen oder endoplasmatisches Retikulum bei Schnitten von Neurospora-Wildtypzellen allgemein nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar (Wiley, W.R. 1974 a). Deshalb soll der überwiegende Teil der hier dargestellten Membranen, die durch das Zellmembran-Leitenzym Oligomycin-resistente ATPase gekennzeichnet sind, als Plasmamembranvesikel angesprochen werden.

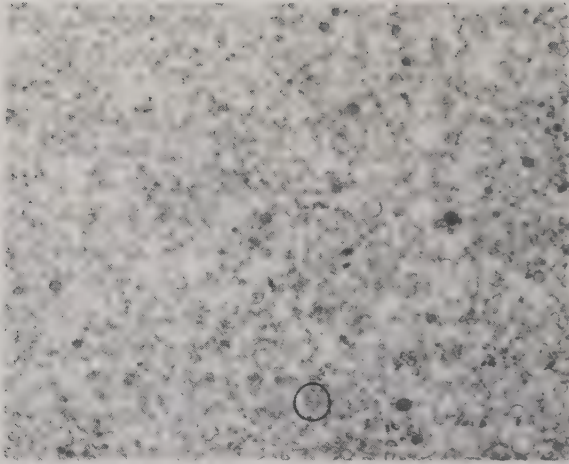


Abb. 14 a

Elektronenoptische Abbildungen von Membranvesikeln aus dem ATPase-peak des in Abb. 13 wiedergegebenen Sucrosegradienten (gepoolte Fraktionen 13 und 15); 28 200fache Vergrößerung;

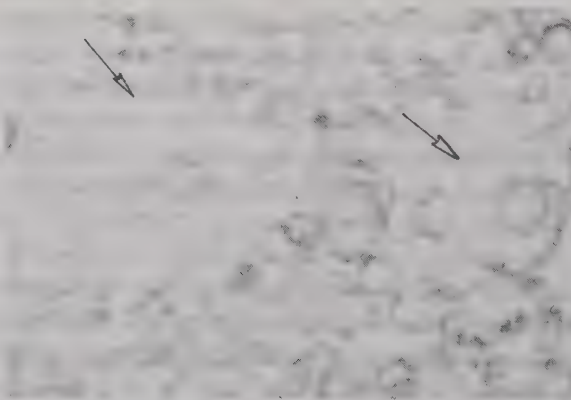


Abb. 14 b

84 600fach vergrößerter Ausschnitt;

In einigen Vesikeln (Abb. 14 a,s. ) sind cristae-ähnliche Strukturen identifizierbar, was auf Mitochondrienfragmente hindeutet. Die hier vereinigten Fraktionen des ATPase-peaks enthalten wie oben beschrieben noch ca. 30 % der auf den Sucrose-gradienten aufgetragenen SDH-Kontamination (= 4 % der Gesamtaktivität der Zellen an SDH) und ca. 60 % der aufgetragenen Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase-Aktivität (= ca. 30 % der gesamten membrangebundenen, Oligomycin-resistenten ATPase-Aktivität). Die Beobachtung von cristae-enhaltenden Vesikeln stimmt also überein mit den auf die Leitenzym-Messungen gestützten Aussagen, daß auch mitochondriale Membranen neben Plasmalemma in dieser Fraktion zu finden sein sollten.

### 9.3 Messung der Ionenabhängigkeit der Oligomycin-resistenten $Mg^{2+}$ -ATPase

Die für Prokaryonten (Baron, C.; Abrams, A., 1971) sowie für Eukaryonten als Zellmembran-Leitenzym beschriebene ATPase zeigte in allen Fällen eine Aktivitätssteigerung durch divalente Ionen wie  $Mg^{2+}$  (Fuhrmann, G. F. et al., 1974). Um auch an Hand der Ionenabhängigkeit die Annahme zu überprüfen, daß die hauptsächlich im P 150 000 sedimentierbare ATPase als Zellmembran-Leitenzym angesprochen werden kann, wurden die im folgenden dargestellten Versuche unternommen.

Tabelle 7 gibt den Vergleich der verschiedenen ATPase-Aktivitäten wieder, die nach unterschiedlicher Ionensupplementierung des Testgemisches gemessen wurden. In allen Fällen war Oligomycin dem Testpuffer beigegeben, um die Oligomycin-sensible mitochondriale ATPase aus der Analyse herauszuhalten. Am Aktivitätsquotienten ist zu sehen, daß  $Mg^{2+}$  die ATPase-Aktivität um den Faktor  $3,08 \pm 0,66$  erhöht (erste Zeile der Tabelle).

Vergleicht man die Aktivität einer Probe, die mit  $Na^+$  und  $K^+$  supplementiert wurde mit der Aktivität einer Probe, die mit  $Mg^{2+}$  supplementiert wurde, so ist ein ähnlicher Aktivitätsquotient von  $2,8 \pm 0,55$  zu finden (zweite Zeile der Tabelle). Der Unterschied zwischen beiden Quotienten ist nicht signifikant. Der errechnete t-Wert von  $t = 0,20$  liegt weit unter dem

bei 1 % bzw. 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschränken von  $t = 3,49$  bzw.  $t = 2,36$ .

Die Zugabe von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  zu einem mit  $\text{Mg}^{2+}$  supplementierten Enzymgemisch bewirkt keine Steigerung der ATPase-Aktivität; der Aktivitätsquotient aus den durch eine bzw. durch drei Ionenarten supplementierten Proben ist  $1,02 \pm 0,16$  (dritte Zeile der Tabelle). Der Unterschied zwischen diesem Quotienten und dem Quotienten der ersten Zeile ist nur bei Voraussetzung von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant. Der errechnete t-Wert von  $t = 3,02$  liegt über der hier gültigen Signifikanzschränke von  $t = 2,30$ , jedoch unter der bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschränke von  $t = 3,35$ .

Der Unterschied zwischen dem Quotient der dritten Zeile und der zweiten Zeile ist signifikant. Der errechnete t-Wert von  $t = 4,58$  liegt über den bei 1 % bzw. 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gültigen Signifikanzschränken von  $t = 3,49$  bzw.  $t = 2,36$ .

Aus den verschiedenen Aktivitätsquotienten wird klar, daß die im P 150 000 meßbare Oligomycin-resistente ATPase ein  $\text{Mg}^{2+}$ -stimulierbares Enzym ist. Die Zugabe der beiden Ionen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  führt in Kombination mit und ohne  $\text{Mg}^{2+}$  nicht zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Diese Daten und der in der Tabelle nicht aufgeführte Befund, daß Strophantin ( $2 \times 10^{-5}$  M) keine Hemmwirkung zeigt, berechtigen zu der Aussage, daß eine Na- und K-stimulierbare ATPase-Aktivität in der hier untersuchten Präparation nicht vorliegt. Diese Ergebnisse entsprechen den bei der Präparation des Hefe-Plasmalemmas erhobenen Befunden (Matile, Ph., 1970 und Fuhrmann, G. F. et al., 1974). Bei der Präparation des Plasmalemmas der Wand-losen Mutante *slime* von *Neurospora* dagegen war zusätzlich zur  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase auch noch eine  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -stimulierbare  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase gefunden worden (Scarborough, G., 1975).

Tabelle 7

|                  | Ionensupplementierung<br>des ATPase-Testge-<br>misches |                 |                | Aktivitätsquotient<br>Probe 1/Probe 2 |
|------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|----------------|---------------------------------------|
|                  | Mg <sup>2+</sup>                                       | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> |                                       |
| Konzentration mM | 10                                                     | 66              | 33             |                                       |
| Probe 1          | +                                                      | -               | -              | 3,08 $\pm$ 0,66                       |
| Probe 2          | -                                                      | -               | -              |                                       |
| Probe 1          | +                                                      | -               | -              | 2,80 $\pm$ 0,55                       |
| Probe 2          | -                                                      | +               | +              |                                       |
| Probe 1          | +                                                      | -               | -              | 1,02 $\pm$ 0,16                       |
| Probe 2          | +                                                      | +               | +              |                                       |

Relative Aktivitäten der Oligomycin-resistenten ATPase des P 150 000 nach unterschiedlicher Ionensupplementierung des Testgemisches.

An dieser Stelle sei noch einmal an das Schema der Abb. 12 A im Abschnitt C.6.2 erinnert, in dem hypothetisch eine Zellmembran-gebundene ATPase als Protonenpumpe zum Aufbau des Protonengradienten über der Zellmembran angenommen wurde. In der Diskussion werden eine Reihe von Befunden zitiert werden, die darauf hinweisen, daß eine ATPase bei Neurospora tatsächlich diese Funktion ausübt (Slayman, C. L. et al., 1973). Diese ATPase ist möglicherweise das hier getestete Mg<sup>2+</sup>-stimulierbare Enzym. Bei Prokaryonten sind ebenfalls derartige Zellmembran-ATPasen gefunden worden, die durch Austreiben von Protonen aus der Zelle das für die Akkumulation der verschiedenen Substrate notwendige Membranpotential gewährleisten (Baron, C.; Abrams, A., 1971).

9.4 Abhängigkeit der Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase-Aktivität vom  $p_H$  des Testgemisches

Neben der Löslichkeit bzw. Membrangebundenheit und der Ionenabhängigkeit eines Enzymes kann weiter die Abhängigkeit seiner Aktivität vom  $p_H$  des Testgemisches zu seiner Beschreibung herangezogen werden. Um die hier als Leitenzym für die Zellmembran angesprochene  $Mg^{2+}$ -ATPase diesbezüglich zu charakterisieren, wurde das  $p_H$ -Muster ihrer Aktivität bestimmt.

Abb. 15 zeigt als Beispiel eine Messung des  $p_H$ -Profils der ATPase-Aktivität des P 150 000. In mehreren (5) Versuchen hat sich ein erstes kleineres Maximum der Aktivität bei  $p_H$   $4,4 \pm 0,12$  bestätigen lassen, welches auch nach Entzug von  $Mg^{2+}$  aus dem Inkubationsgemisch noch zu messen war. Daneben fällt ein größeres, zweites Maximum der Aktivität bei  $p_H$   $6,6 \pm 0,12$  auf, welches jedoch nur bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen im Testgemisch meßbar war.

Die Existenz zweier unterschiedlicher  $p_H$ -Optima der ATPase-Aktivität im P 150 000 mit unterschiedlicher Ionenabhängigkeit deutet möglicherweise auf zwei Oligomycin-resistente ATPasen in dieser Zellfraktion hin. Es muß offen bleiben, ob das Enzym mit dem  $p_H$ -Optimum bei  $p_H$  4,4 auch als Zellmembranleitenzym gelten kann, wie dies für die Hauptaktivität, das Enzym mit dem  $p_H$ -Optimum bei  $p_H$  6,6, gesichert scheint. Versuche, beide Aktivitäten voneinander zu trennen, wurden bisher nur bei Präparationen des Hefeplasmalemma unternommen, wo ganz analog zwei ähnliche  $p_H$ -Optima der ATPase-Aktivität gefunden wurden (Nurminen, T.; Oura, E., 1970). Hier war das Enzym mit dem Optimum im sauren  $p_H$ -Bereich im Gegensatz zu dem Enzym mit dem Optimum im neutralen  $p_H$ -Bereich durch Helicaseeinwirkung aus Partikeln in Lösung zu setzen, woraus die Autoren auf eine Bindung dieses Proteins in der Chitinwand der Hefezelle schlossen.

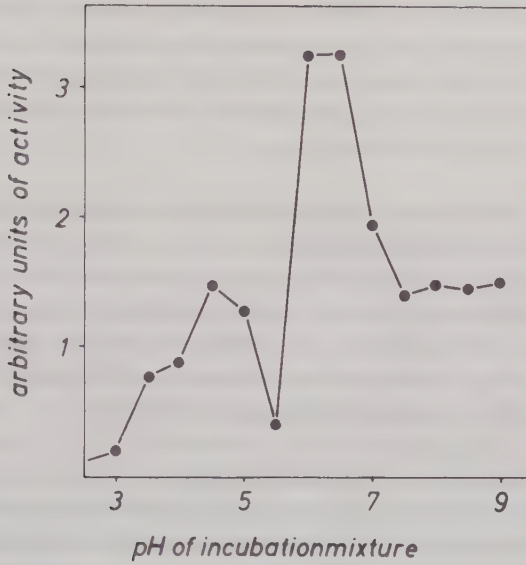


Abb. 15

Abhängigkeit der Oligomycin-resistenten ATPase-Aktivität des  
P 150 000 vom pH des Testgemisches;

Bedingungen wie bei Abb. 3;

10      Messung der Bindeaffinität der isolierten  
Zellmembranvesikel für Glucose

Die Isolierung von Zellmembranvesikeln von Neurospora-Zellen war unternommen worden, um das GTS II anzureichern, das die Zellmembran selektiv permeabel macht für Glucose und ähnliche Zucker. Entsprechend sollten solche Präparationen eine Bindeaffinität für Substrate des GTS II wie 3-O-mglc besitzen, zumal da es sich beim GTS II um ein hochaffines Transportsystem handelt ( $K_m = 37 \mu M$  für 3-O-mglc).

Versuche zur Messung der Bindeaktivität von Teilkomponenten verschiedener Transportsysteme waren in einer Reihe von Fällen erfolgreich. Neben der Fülle der positiven Befunde bei bakteriellen Bindeproteinen war sowohl in Extrakten von Zellmembranpräparationen von Hefen (Horak, J.; Kotyk A., 1973), als auch in der Fraktion der Schockproteine von Neurospora (Hack, A., 1974) eine spezifische Glucose-Bindeaktivität meßbar.

Für solche Messungen stehen im wesentlichen drei verschiedene Techniken zur Verfügung. Es sind dies die Silikon-Filtrations-Zentrifugation, die Druckfiltration durch Protein-rückhaltende Filter und die Gleichgewichtsdiffusion mit Dialyseschläuchen. Zwei dieser Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit zur Messung der Bindeaktivität von Zellmembranpräparaten angewandt.

10.1      Gleichgewichtsdialyse von  $^{14}C$ -3-O-mglc-inkubierten  
Zellmembranvesikeln

Zur Prüfung, ob die Zellmembranvesikel des P 150 000 eine Bindeaktivität für GTS II-Substrate wie 3-O-mglc besitzen, wurde zuerst das methodisch einfachste Verfahren, nämlich die Gleichgewichtsdialyse, benutzt. Dabei werden die im Dialyseschlauch eingeschlossenen Membranen gegen ein radioaktives Substrat dialysiert. Findet sich nach Einstellung des Gleichgewichtes in der Vesikelpopulation pro Aliquot ein höherer Radioaktivitätsanteil als im DialysemEDIUM, so deutet dies auf eine Bindeaktivität der Membranvesikel hin. Eine spezifische Bindung von  $^{14}C$ -3-O-mglc an einzelne, auf die Anwesenheit von

Bindekomponenten des GTS II zurückzuführende Bindestellen sollte daran erkennbar sein, daß sie durch Zugabe von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc in Kontrolldialysen verhindert werden kann.

Im Falle einer spezifischen Bindung sollten sich Membranen, präpariert aus im GTS II dereprimierten Zellen, in ihrer Bindeaktivität von Membranen unterscheiden, die aus reprimierten Zellen präpariert wurden. Diese Zellen haben eine um den Faktor 3 niedrigere Affinität und eine um den Faktor 5 erniedrigte  $V_{\max}$  für den Transport der 3-O-mglc (siehe Tabelle Nr. 2).

Im nachfolgend besprochenen Versuch wurde die aus dereprimierten sowie aus reprimierten Zellen gewonnene Fraktion der Membranvesikel des P 150 000 und die Fraktion der Zellwände (P 2 000) mit teilweise anhaftenden Zellmembranen (siehe ATPase-Aktivität dieser Fraktion in Tabelle 6) auf 3-O-mglc-Bindung hin untersucht. Für diese und die unten beschriebenen Bindetests wurden die Zellfraktionen in hochreinem, Glucose-freiem Sucrose-Auflösungsmedium gewonnen. Nachdem in vorhergegangenen Experimenten an diesen Zellfraktionen selbst keine Bindung nachweisbar war, wurden in dem in Tabelle 8 wiedergegebenen Versuch Detergensextrakte von P 150 000 und P 2 000 eingesetzt. Als mildes nichtionisches Detergens wurde Tween 80 (4%ig) verwendet, mit dem es bei Hefe gelungen war, aus Zellmembranen mit kaum meßbarer spezifischer Bindeaktivität für Glucose einen Extrakt mit relativ gut reproduzierbarer Glucose-Bindeaktivität anzureichern (Horak, J.; Kotyk, A., 1973).

Folgende Befunde dieses Experimentes sind aus Tab. 8 zu ersehen:

- a) Weder bei P 150 000 noch bei P 2 000 ist eine Anreicherung des radioaktiven GTS II-Substrates  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc im Dialyseschlauch zu finden. Vielmehr wird bei allen Messungen im Inneren des Dialyseschlauches eine geringfügig niedrigere Radioaktivität gemessen als im Dialyse-Puffer.
- b) Eine Zugabe von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc (1 mM) zu den 0,3  $\mu\text{Ci}$  eingesetzter  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc ( $6,6 \times 10^{-5}$  mM) in den Kontrolldialysen bewirkt in beiden Zellfraktionen eine Reduzierung der in den Dialyseschläuchen zu messenden Radioaktivität gegenüber den ohne kalte 3-O-mglc dialysierten Proben.

- c) Die nach Zugabe von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc festgestellte Reduzierung der im Dialyseschlauch zu messenden  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-counts ist bei den Tween-80-Extrakten der Zellfraktionen von reprimierten und dereprimierten Zellen gleichermaßen zu beobachten.

Die Tatsache, daß die Zugabe von unmarkierter 3-O-mglc eine Reduzierung der im Dialyseschlauch zu messenden  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Radioaktivität, wohl durch kompetitive Hemmung spezifischer Bindestellen, bewirkt (Befund b), könnte als Hinweis für eine Glucose-Bindeaktivität in den Tween-80-Extrakten von Zellwand- und Zellmembran-Fraktion gedeutet werden.

Schwer vereinbar mit dieser Vorstellung ist jedoch der Befund a, daß in keinem Falle überhaupt eine Anreicherung von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc im Dialyseschlauch zu messen war, und ebenso der Befund c, daß die  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc-bedingte Reduzierung der  $^{14}\text{C}$ -counts bei Membranen von reprimierten und dereprimierten Zellen gleich stark ausgefallen ist. Zu erwarten wäre doch, daß nach Neusynthese von GTS II-spezifischen Bindeproteinen bzw. Carriermolekülen in ausgehungerten Zellen eine höhere Bindeaktivität bzw. umgekehrt eine stärkere kompetitive Hemmung dieser Bindestellen durch unmarkiertes Substrat nachweisbar sein müßte. Eine Glucose-Bindefähigkeit von Tween-80-Extrakten aus der Zellwand- und der Zellmembran-Fraktion von Neurospora ist demnach mit der hier angewandten Methode nicht gefunden worden.

Die Ursache dafür, daß mit der Gleichgewichtsdialyse weder an P 2 000 und P 150 000 (eigene unveröffentlichte Ergebnisse), noch an daraus gewonnenen Detergensextrakten eine Bindeaktivität meßbar war, könnte sein, daß mit dieser Methode das an das Protein gebundene radioaktive Substrat nicht von demjenigen abgetrennt werden kann, das ungebunden bleibt. Es muß daher die Bindeaktivität gegen eine sehr hohe background-Aktivität gemessen werden. Eben dieser Nachteil fällt bei der Silicon-Filtrations-Zentrifugation weg, die im folgenden als Test für GST II-spezifische Bindeaktivität versucht wurde.

Tabelle 8

|                                                                                                                             |        | getestete Zellfraktion   |                                     |                                     |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                                                                                                             |        | P 150 000                |                                     | P 2 000                             |                                     |
|                                                                                                                             |        | $^{12}\text{C-3-O-mgIc}$ | $+ \text{ } ^{12}\text{C-3-O-mgIc}$ | $- \text{ } ^{12}\text{C-3-O-mgIc}$ | $+ \text{ } ^{12}\text{C-3-O-mgIc}$ |
| $^{14}\text{C-3-O-mgIc}$ -Meßwert<br>im Außenmedium des<br>Dialyseschlauches                                                |        | 8519 $\pm$ 84            | 8571 $\pm$ 37                       | 8519 $\pm$ 84                       | 8571 $\pm$ 37                       |
| $^{14}\text{C-3-O-mgIc}$ -Meßwert<br>im Dialyseschlauch;<br>Extrakte aus Zell-<br>fraktionen von de-<br>reprimierten Zellen |        | 8480 $\pm$ 89            | 8283 $\pm$ 27                       | 8511 $\pm$ 90                       | 8345 $\pm$ 57                       |
| $^{14}\text{C-3-O-mgIc}$ Meßwert<br>im Dialyseschlauch;<br>Extrakte aus Zell-<br>fraktionen von<br>reprimierten Zellen      |        | 8482 $\pm$ 49            | 8301 $\pm$ 29                       | 8514 $\pm$ 70                       | 8170 $\pm$ 25                       |
| Proteineinsatz<br>(mg/ml)                                                                                                   | derep. | 4,6                      | 4,6                                 | 1,7                                 | 1,7                                 |
|                                                                                                                             | rep.   | 1,7                      | 1,7                                 | 1,4                                 | 1,4                                 |

Gleichgewichtsdialyse von Tween-80-Extrakten des P 150 000 und des P 2 000 zur Bestimmung ihrer  $^{14}\text{C-3-O-mgIc}$ -Bindeaktivität; Mittelwerte der gemessenen Radioaktivität (cpm/50  $\mu\text{l}$ ) und mittlere Fehler der Probenentnahme wurden jeweils berechnet aus Daten von 10 Aliquots eines Dialyseversuches.

## 10.2 Silicon-Filtrations-Zentrifugation von $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-inkubierten Zellmembranvesikeln

Die Silikonfiltration ist eine speziell für Membranpräparationen entwickelte Bindetesttechnik. Die Permeationskinetik von z. B. Carbonsäuren und anderen Substraten in submitochondrialen Membranvesikeln oder in Thylakoidvesikeln von Chloroplasten war damit nachweisbar (Heldt, H. W.; Sauer, F., 1971).

Es wurden hier entsprechend dem unter B.12.2 wiedergegebenen Versuchsschema Zellmembran-Vesikel des P 150 000 von ausgehungerten, im GTS II induzierten Zellen nach Inkubation mit dem zu testenden Substrat auf Zentrifugenröhrchen aufgetragen. Sie wurden dann mittels einer 60minütigen Zentrifugation bei ca. 150 000 g durch eine Schicht von Siliconöl von geeigneter Dichte getrieben, wobei das anhaftende leichtere, mit Silicon nicht mischbare Inkubationsgemisch abgestreift wird. Nach der Silicon-Passage gelangten die Membranen auf ein Kissen von CsCl, das nach Homogenisieren auf Radioaktivität hin untersucht wurde.

Ergebnisse entsprechender  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc Bindetests mit Membranpräparationen von Neurospora sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Bei den Röhrchen 1 bis 6 mit abnehmender Konzentration von beigemischter kalter  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc (1 000 - 0,5  $\mu\text{M}$ ) und gleichbleibendem Anteil an  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc ( $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{Ci/Röhrchen}$ ) sollte eine Bindung des  $^{14}\text{C}$ -markierten GTS II-Substrates nur in den Röhrchen 4 bis 6 möglich sein. In den Röhrchen 1 bis 3 jedoch sollte der große Anteil von unmarkierter 3-O-mglc zur kompetitiven Besetzung der limitierten, diskreten Bindungsstellen durch  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc führen ( $K_m$  von induzierten Neurosporazellen für 3-O-mglc = 37  $\mu\text{M}$ ).

Nach Zentrifugation zeigte sich jedoch, daß in allen 6 Röhrchen ohne Unterschied ca. 0,4 % der Radioaktivität des Inkubationsgemisches im CsCl-Kissen zu finden waren. Das gleiche Ergebnis war auch bei dem Kontrollröhrchen 7 zu messen, bei dem anstelle von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc 0,5  $\mu\text{Ci } ^3\text{H}_2\text{O}$  pro Röhrchen eingesetzt waren. Auch hier tauchten nach Zentrifugation der Membranen 0,32 % der Radioaktivität des Inkubationsgemisches im CsCl-Kissen auf. Die im Röhrchen 7 im CsCl-Kissen gefundene  $^3\text{H}_2\text{O}$ -Menge gibt die Empfindlich-

## Röhrchen-Nr.

variable

Zugaben im

Inkubationsgemisch

| 1                        | 2      | 3      | 4                | 5               | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------|--------|--------|------------------|-----------------|---|---|---|
| $^{12}\text{C-3-O-mglc}$ | 1,0 mM | 0,1 mM | 50 $\mu\text{m}$ | 5 $\mu\text{M}$ | - | - | - |
| $^{14}\text{C-3-O-mglc}$ | +      | +      | +                | +               | + | - | + |
| $^3\text{H}_2\text{O}$   | -      | -      | -                | -               | - | + | - |
| P 150 000                | +      | +      | +                | +               | + | + | - |

Ergebnisse

|                          |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| cpm in 1 ml Inkubations- | 29 757 | 29 222 | 31 573 | 30 821 | 32 035 | 32 327 | 63 150 | 28 558 |
| gemisch                  |        |        |        |        |        |        |        |        |
| cpm in 1 ml CsCl         | 117    | 113    | 115    | 111    | 119    | 144    | 199    | 8      |
| %                        | 0,40   | 0,39   | 0,37   | 0,36   | 0,37   | 0,45   | 0,32   | 0,028  |

Versuchsergebnisse einer Silicon-Filtrations-Zentrifugation von P 150 000 zur Bestimmung seiner  $^{14}\text{C-3-O-mglc}$ -Bindeaktivität; die Mittelwerte der gemessenen Radioaktivität wurden jeweils berechnet aus Daten von 10 Entnahmen a 50  $\mu\text{l}$  aus den entsprechenden Röhrchenfraktionen.

keit der Siliconfiltrationstechnik unter den hier gewählten Bedingungen an. Diese Menge an Inkubationsgemisch gelangt offenbar als nicht abstreifbare Benetzung der Vesikel oder als Einschluß in den Vesikeln durch die hydrophobe Barriere des Zentrifugenröhrchens. Dieser background an unspezifisch an die Membranen gebundener Radioaktivität ist in den Röhrchen 1 bis 6 zu substrahieren.

Beim Vergleich der durch die Siliconfiltrationstechnik gegebenen prozentualen  $^3\text{H}$ -background-Radioaktivität mit der in den Röhrchen 1 bis 6 im CsCl-Kissen gemessenen prozentualen  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Radioaktivität in diesem und ähnlichen Experimenten ist kein deutlicher Unterschied festzustellen. Die eingesetzten Membranen binden nicht mehr  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc als  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

Die gemessene Radioaktivität gelangt nicht durch Diffusion oder andere Versuchsfehler, sondern vielmehr mit Hilfe der eingesetzten Membranvesikel durch das Siliconöl. Dies zeigt das Röhrchen 8, bei dem wohl  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc aber keine Membranen eingesetzt waren. In diesem Röhrchen ist keine über den background der Scintillationszählung hinausgehende Radioaktivität im CsCl meßbar.

Die Ergebnisse in den Kontrollröhrchen und der Befund, daß in diesem und ähnlichen Experimenten keinerlei Hemmung der  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc-Bindung durch steigende Mengen von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc im Inkubationsgemisch zu beobachten war, sind nicht mit der Vorstellung einer GTS II-spezifischen Bindung vereinbar. Eine spezifische Bindung von  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc an limitierte, einzelne Bindungsstellen, die auf eine Anwesenheit von Komponenten des GTS II in der Membranpräparation hindeuten würde, müßte in jedem Falle kompetitiv hemmbar sein durch Zugabe von  $^{12}\text{C}$ -3-O-mglc.

Weder durch das Ersetzen des Tris-Puffers  $p_{\text{H}}$  7,0 im Inkubationsgemisch durch den in Transportversuchen in vivo optimalen Fries-Citratpuffer  $p_{\text{H}}$  4,75 noch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit der Vesikel vor der Siliconfiltrations-Zentrifugation konnte eine über den background der Methode hinausgehende Bindung des Substrates an die Membranen nachgewiesen werden.

Bei isolierten Zellmembranvesikeln von *E.coli* konnte gezeigt werden, daß diese z. B. noch zum Transport von Glycin, Prolin und verschiedener Zucker in der Lage sind. Im Falle des PTS von *E.coli* (siehe Einleitung) bewirkte eine Zugabe der während der Präparation abgetrennten löslichen Komponenten HPr und Enzym I zum PEP-haltigen Inkubationsgemisch eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung und damit Akkumulation des zur Aufnahme in die Vesikel angebotenen Substrates  $\alpha$ -Methylglucosid (Kaback, H. R., 1970 b).

Um zu untersuchen, ob das Unvermögen der Zellmembranvesikel von *Neurospora*  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc zu binden auf den Verlust löslicher Komponenten während ihrer Präparation beruht, wurden bei einem Siliconfiltrationsexperiment lösliche Proteine des Überstandes nach 150 000 g Zentrifugation (0,4 mg pro 1,3 mg Protein des P 150 000) zugemischt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen bei Zellmembranvesikeln von *E.coli* war bei Zellmembranvesikeln von *Neurospora* jedoch keine Steigerung der Bindung und keine Akkumulation des GTS II-Substrates 3-O-mglc zu messen.

Die Messung von GTS II-spezifischer Bindeaktivität in Membranpräparationen von *Neurospora* scheint prinzipiell schwierig zu sein. Andere Autoren versuchten mit Hilfe einer unterschiedlichen Methode aus *Neurospora*-Protoplasten Zellmembranvesikel zu präparieren (Wiley, W. R., 1974 a und b). Auch diese zeigten jedoch keine Fähigkeit, Glucose zu binden oder zu transportieren. Von anderen Autoren wurde in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß die von Wiley aus Protoplasten präparierten Zellmembranvesikel keine ATPase-Aktivität besitzen (Slayman, C. W., 1974). Das heißt, die Unfähigkeit dieser Vesikel, Glucose zu akkumulieren, könnte auf einen Verlust des den Energie-input besorgenden Apparates dieser Membranen zurückzuführen sein. Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zellmembranvesikel wie unter C.9.1 bis C.9.3 gezeigt, durch eine Membran-gebundene  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase ausgezeichnet sind, sollte hier mindestens diese eine Voraussetzung für die aktive Aufnahme von GTS II-Substraten gegeben sein. Um jedoch das Problem des Energie-inputs in das eventuell in den Vesikeln integrierte GTS II noch weiter zu vereinfachen, wurde in Anlehnung an das unter C.6.2 wahrscheinlich gemachte Modell des Glucose-Protonen-Symportes versucht, die Vesikel durch Anlegen eines  $\text{p}_\text{H}$ -Gradienten von 2,5 Einheiten zur Akkumulation von

3-O-mglc zu zwingen (Versuchsschema in Abb. 16). Hierbei wäre also die Zellmembran-ATPase keine notwendige Voraussetzung für die Akkumulation, da das Ergebnis ihrer Aktivität in ganzen Zellen, der Aufbau eines Protonengradienten, bereits durch die experimentellen Bedingungen vorgegeben ist. Entsprechend dem in Abb. 12, Teil B wiedergegebenen Modell des Glucose-Protonen-Symportes sollte eine im Vergleich zum Vesikelinneren um 2,5 Zehnerpotenzen höhere Protonenkonzentration im Außenmedium einen Glucose-Protonen-Einstrom in die Zellmembranvesikel bewirken. Um dies zu ermöglichen, wurden in Trispuffer  $p_H$  7,5 frisch präparierte Membranvesikel um den Faktor 1/10 in  $^{14}C$ -haltigem Inkubationsgemisch vom  $p_H$  4,75 verdünnt ( $p_H$  in der Mischung = 5,0). Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 30 °C wurden die Membranen der Siliconfiltrationszentrifugation unterworfen. Auch bei diesem Experiment war jedoch keine über den  $^3H_2O$ -Bindungsbackground hinausgehende Bindungsaffinität oder gar Akkumulation der 3-O-mglc festzustellen.

Gegen dieses Experiment könnte vorgebracht werden, daß in der Kontrolle durch den Protonengradienten etwaige dissoziierte  $^3H^+$ -Ionen in die Vesikel getrieben würden, und somit die Radioaktivität des Kontrolllaufes zu hoch läge. Dieser Einwand ist bei Kalkulation der bei  $pH$  5 vorliegenden Protonenkonzentration und bei Berücksichtigung der eingesetzten spezifischen Radioaktivität jedoch nicht von Gewicht.

In der Diskussion wird auf einen bereits sehr wahrscheinlich gemachten Deutungsvorschlag für den negativen Ausfall des zuletzt beschriebenen Experimentes näher eingegangen, wonach der angelegte künstliche Protonengradient durch die Entkoppler-ähnliche Wirkung freier, in der Membran gelöster Fettsäuren zerstört wird und deshalb eine Protonen-getriebene Glucose-Akkumulation nicht beobachtet werden kann.

Im folgenden sollen nach den bisher dargestellten Befunden von nach Zellaufschluß gewonnen Zellmembranvesikeln Ergebnisse zitiert werden, die zeigen, daß mit der Technik des osmotischen Schocks aus ganzen Zellen tatsächlich Glucose-Bindeaktivität mit der gleichen Substrat-Spezifität wie das GTS II in Lösung zu bringen ist (Hack, A., 1974).

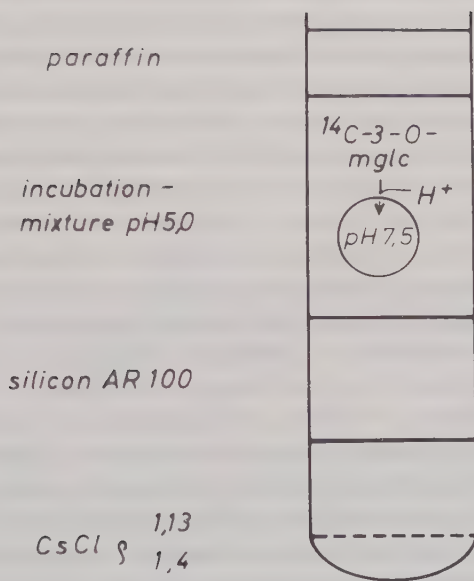


Abb. 16

Schema zu dem Versuch, durch Anlegen eines Protonengradienten, Membranvesikel des P 150 000 zur Akkumulation von Glucose zu zwingen.

Präparation der Membranvesikel bei pH 7,5; Inkubation bei pH 5,0 mit  $^{14}\text{C}$ -3-O-mglc bzw.  $^3\text{H}_2\text{O}$  (Kontrolle); Silikonfiltration der Membranen auf ein CsCl-Kissen von 1,4 g ; Ermittlung der durch die Membranen in das CsCl eingeführten Radioaktivität.

Isolierung peripherer Membranproteine durch osmotischen Schock von angekeimten Konidien

Die Zellfraktion der Schockproteine enthält eine Reihe relativ leicht in Lösung zu bringender Zellmembranproteine sowie periplasmatische Enzyme. Gewonnen werden diese Proteine dadurch, daß man angekeimtes Neurospora-Mycel kurzzeitig (15 Minuten lang) z. B. in 1,5 M Mannitol inkubiert, welches in die Zellen nicht eindringt. Daraufhin werden die Zellen in destilliertem Wasser suspendiert, wonach sie osmotisch rasch Wasser aufnehmen, durch die rigide Zellwand aber vor dem Zerplatzen geschützt bleiben. Bei diesem Vorgang werden nun auch bei Neurospora Zellmembranproteine wie z. B. die im vorangegangenen beschriebene Oligomycin-resistente  $Mg^{2+}$ -ATPase oder periplasmatische Enzyme wie die alkalische Phosphatase von den Zellen in Folge des starken osmotischen Druckes abgegeben. Die in vivo Membran-gebundenen Proteine sind dann in der Schockflüssigkeit frei in Lösung nachweisbar.

Der Befund, daß die Schockproteine von cytoplasmatischen Enzymen wie der SDH oder Tryptophansynthetase frei sind (Hack, A., 1974; Wiley, W. R., 1970), läßt den osmotischen Schock als eine sehr spezifische Methode der selektiven Isolierung von Membranproteinen erscheinen. Da Zellwand und Zellmembran beim Schock intakt bleiben, fungieren sie praktisch als biologische Filter, die die Masse der cytoplasmatischen Proteine zurückhalten und nur wenige Wand- und Membran-ständige Proteine (ca. 30 Proteinspezies nach Hack) in Lösung gehen lassen. Die hohe Spezifität der Schockproteine ist wohl auch der Grund dafür, daß es bei dieser Zellfraktion im Gegensatz zur Zellmembranfraktion möglich war, eine Bindung von  $^{14}C$ -Glucose nachzuweisen (Hack, A., 1974). Die nach Einengung durch Protein-rückhaltende Filter von den Schockproteinen gebundene Radioaktivität betrug das doppelte der background-Radioaktivität (= Bindung an Hitze-denaturierte Schockproteine).

Wie weiter gezeigt werden konnte, ist die Glucose-Bindeaktivität der Schockproteine - wie in vivo der vom GTS II katalysierte Glucose-Transport - durch Zugabe von Sorbose zum Bindetestgemisch kompetitiv hemmbar, nicht jedoch durch Zugabe von Galactose und Fructose. Diese Identität der Substratspezifität des GTS II einerseits und der Glucose-bindenden Komponente der Schockproteine

andererseits berechtigt zu der Annahme, daß diese wohl als Teilkomponente des GTS II angesehen werden darf.

Die Versuche über die Isolierung Glucose-bindender Schockproteine wurden an dieser Stelle referiert, um zu zeigen, daß hier eine für die Identifizierung von GTS II-Komponenten interessante Zellfraktion gefunden wurde. Im folgenden wird darum auch die Zellfraktion der Schockproteine neben den Zellfraktionen der Zellmembranen im P 150 000 und der löslichen Proteine (S 150 000) in die weitere Analyse mit Hilfe der differentiellen Isotopen-Doppelmarkierung mit eingeschlossen.

12      Anwendung der differentiellen Isotopen-Doppelmarkierung zur Identifizierung von dereprimierbaren GTS II-Proteinen

In den oben beschriebenen Versuchen zur Messung von Glucose-Bindeaktivität der Zellmembranvesikel des P 150 000 war deutlich geworden, daß u. U. der hohe Gehalt an nicht-Glucose-bindenden Proteinen in dieser Zellfraktion für die negativen Ergebnisse verantwortlich ist. Um die hier interessierende Proteinspezies aus der Überzahl der anderen nicht zum GTS II gehörenden Proteine herauszuheben, kann ihre spezifische Markierung mit radioaktiven Isotopen angestrebt werden. Voraussetzung dafür ist, daß Bedingungen geschaffen werden können, unter denen der Einbau der angebotenen radioaktiven Isotope in die gesuchte Komponente deutlich stärker oder anders als in die restlichen Zellkomponenten erfolgt. Diese Voraussetzung ist z. B. dann gegeben, wenn die Dereprimierbarkeit des gesuchten Proteins vorliegt, oder wenn Mutanten vorhanden sind, welche die gesuchte Komponente nicht mehr bilden.

Bei dem dereprimierbaren GTS II ist die erste Voraussetzung erfüllt; innerhalb von ca. 90 Minuten Aushungerungszeit angekeimter Zellen ist eine 5fache Steigerung ihrer maximalen Glucose-Transportrate ( $V_{\max}$ ) zu beobachten (siehe Tabelle 2). Dieser raschen Zunahme entspricht, wie unter C.6.1 dargelegt, eine 5fache Zunahme der den Glucose-Transport katalysierenden aktiven Permeasemoleküle gegenüber dem reprimierten Zustand der Zelle.

Auch Mutanten mit zumindest veränderter GTS II-Aktivität sind vorhanden (siehe jedoch einschränkend C.7).

Im folgenden sind Ergebnisse von Doppelmarkierungsversuchen dargestellt, die unter Ausnützung der Dereprimierbarkeit des GTS II durchgeführt wurden. Anders als im Falle der Messung z. B. der spezifischen Glucose-Bindeaktivität gehen hier nun nicht alle in den isolierten Zellfraktionen enthaltenen Proteine in die Analyse mit ein, sondern vielmehr nur die Proteine, die in der rasch ablaufenden Derepression des GTS II während der kurzzeitigen Markierung (15 Minuten lang) durch radioaktive Aminosäuren kenntlich gemacht wurden.

Das Übersichtsschema eines solchen differentiellen Doppelmarkierungsversuchs ist in Abb. 1 wiedergegeben. Es wurde hier die eine Hälfte der Population von angekeimten Zellen durch Entzug von Glucose im GTS II dereprimiert und während der Zeit der stärksten Neusynthese des Transport-Systems zwischen 15 und 30 Minuten Aushungerung (siehe Abb. 5, Teil B) mit  $^3\text{H}$ -Leucin markiert. Die andere Hälfte der Zellpopulation wurde zur gleichen Zeit durch Glucose reprimiert und mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin markiert (Gründe für die Verwendung von Leucin siehe B.8). Nach Vereinigung beider Subkulturen wurden die Zellen gemeinsam aufgeschlossen. Danach wurde nach B.9.2 die Fraktion der im P 150 000 enthaltenen Plasmamembranen und die Fraktion der löslichen Enzyme isoliert. In unabhängigen Versuchen wurde alternativ nach B.9.1 durch osmotischen Schock von ganzen Zellen die Fraktion der Schockproteine gewonnen.

Alle drei differentiell doppelmarkierten Zellfraktionen wurden dann dem Übersichtsschema entsprechend in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SPAGE) aufgetrennt. Um die partikelgebundenen Proteine der im P 150 000 angereicherten Plasmamembranen von Neurospora in Lösung zu bringen, wurden SDS/Mercaptoäthanol-Extrakte nach B.13 hergestellt. Auch die an sich schon löslichen Proteine der beiden anderen Zellfraktionen wurden der Vergleichbarkeit halber dieser Denaturierung unterworfen. In der SPAGE wandern Proteine mit kleinem Molekulargewicht rasch im Gel von der Kathode (-) zur Anode (+), Proteine mit größerem Molekulargewicht wandern entsprechend langsamer. Ladungsunterschiede der einzelnen Proteinspezies fallen in der SPAGE

nicht auf. Die mit SDS komplexierten Proteine tragen alle nahezu dieselbe Anzahl vom SDS ausgehende negative Ladungen pro Masseneinheit.

Nach der Auftrennung der Proteine wurde die verschiedenenergetische  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität in den einzelnen Proteinbänden im Gel ermittelt. Komponenten des GTS II, die nur unter Glucose-Entzug in Neurospora zellen neusynthetisiert werden, sollten als  $^3\text{H}$ -markiertes Protein an einer Stelle im Gel nachweisbar sein, die kein entsprechendes  $^{14}\text{C}$ -markiertes Protein enthält. Am deutlichsten fallen solche Proteine auf, wenn man, wie im Übersichtsschema in Abb. 1 aufgezeigt, zusätzlich zum  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster im Gel noch die Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität pro Fraktion errechnet. Durch Glucose-Entzug dereprimierbare Proteine werden so als Fraktionen mit höherer prozentualer  $^3\text{H}$ - als  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität kenntlich

13      Analyse der differentiell doppelmarkierten Zellfraktion  
der löslichen Proteine (S 150 000)

Als erstes Beispiel soll in Abb. 17 eine Auftrennung der löslichen Proteine von Neurospora gezeigt werden. Im unteren Teil der Abbildung ist das  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster dieser in ausgehungerten Zellen markierten Proteine im Gel wiedergegeben. Das analoge Radioaktivitätsmuster der in den Glucose-reprimierten Zellen durch  $^{14}\text{C}$ -Leucin markierten Proteine, die im selben Gel aufgetrennt worden waren, wurde der Übersichtlichkeit halber nicht in die Abbildung mit aufgenommen. Unterschiede zwischen beiden Radioaktivitätsmustern sieht man wie erwähnt am besten an der im oberen Teil der Abbildung beigegebenen Linie der Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ - und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität.

Unter den nahezu 20 im Gel aufgetrennten, markierten Proteinbänden sind nun in Abb. 17 mindestens zwei zu finden, die durch eine gegenüber dem  $^{14}\text{C}$ -background gesteigerte prozentuale  $^3\text{H}$ -Radioaktivität auffallen (Radioaktivitätsmaximum in den Fraktionen 12 bzw. 15).

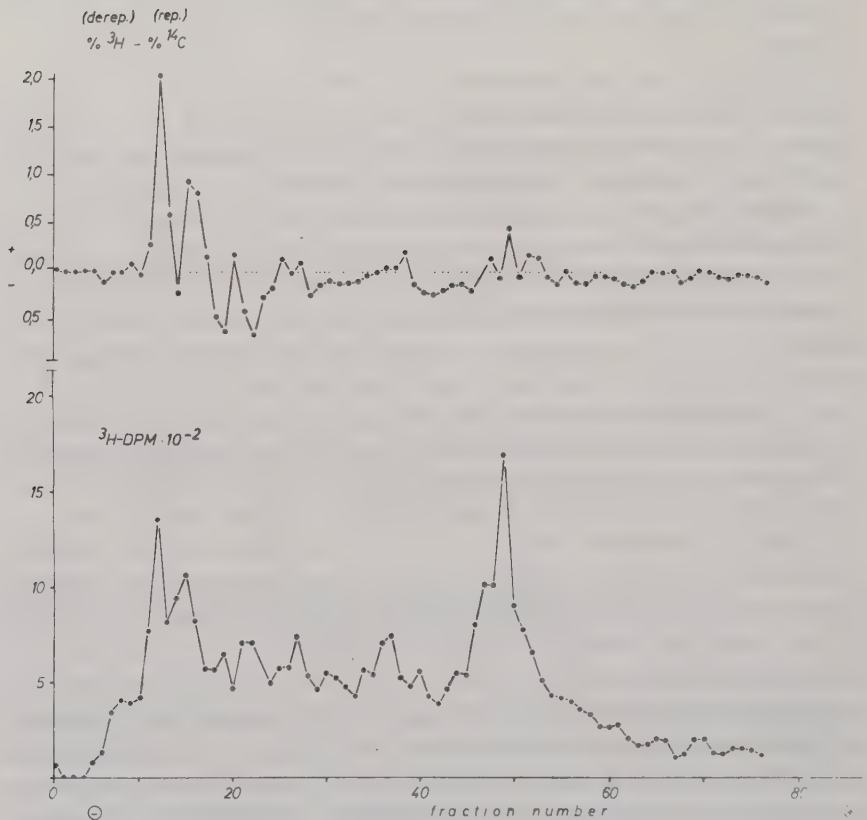


Abb. 17

Analyse einer SPAGE-Auftrennung differentiell doppelmarkierter löslicher Proteine von *Neurospora* (Überstand der 150 000 g Zentrifugation)

Untere Kurve:  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster der in der ausgehungerten Hälfte der Kultur synthetisierten Proteine; ( $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster der in der Glucose-reprimierten Hälfte der Kultur synthetisierten Proteine nicht wiedergegeben;)

Obere Kurve: Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ -Aktivität/Fraktion und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität/Fraktion.

Mindestens zwei lösliche Proteine mit den Radioaktivitätsmaxima in Fraktion 19 und 22 zeigen umgekehrt ein Überwiegen der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität über die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität.

Um die Reproduzierbarkeit dieser und weiter zu erhebender Befunde zu sichern, wurden jeweils verschiedene Gele mit Proteinen derselben Präparation sowie Gele mit Proteinauftrennungen von unabhängigen Präparationen analysiert. Die oben beschriebenen Befunde treten in allen Wiederholungs-Gelel zutage.

Um weiter zu zeigen, daß die beobachteten Anreicherungen der verschiedenen Radionuklide in den einzelnen Proteinbanden nicht als Artefakte auf eine fehlerhafte Diskriminierung der verschiedenen energetischen Zerfallsimpulse zurückzuführen sind, wurden Kontrollmarkierungen durchgeführt. Dazu wurden zwei Hälften einer Zellpopulation einheitlich ausgehungert und die eine Subkultur mit  $^3\text{H}$ -Leucin, die andere Subkultur mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin markiert. Wenn nun Artefakte, z. B. unterschiedlich starke Löschung der Aktivität eines der beiden Nuklide in den verschiedenen stark gefärbten Gelfractionen vorlägen, so müßten auch die Kontrollgele in den entsprechenden Fraktionen die vorgetäuschten Anreicherungen eines Isotopes aufweisen.

Abb. 18 zeigt das Radioaktivitätsmuster in solch einem Kontrollgel mit einheitlich doppelmarkierten löslichen Proteinen. Die Abstände der einzelnen radioaktiven Banden sind in diesem Gel weiter als in der entsprechenden Abb. 17, dennoch sind die homologen Proteine beider Auftrennungen zu erkennen. Aus dem um die O-Linie pendelnden Kurvenzug des Differenzbetrages der prozentualen  $^3\text{H}$ - und der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität ist die Genauigkeit der bei allen Gelfractionen durch den Computer vorgenommen Löschkorrekturberechnung (siehe B.13.4) abzulesen. Alle über die hier beobachteten Schwankungen hinausgehenden Ausschläge dieses Differenzwertes in Gelen mit differentiell doppelmarkierten Proteinen dürfen als biologisch bedingte Unterschiede angesehen werden.

Demnach weisen die beiden löslichen, differentiell doppelmarkierten Neurospora-Proteine in Abb. 17 mit ihrem Radioaktivitätsmaximum in Fraktion 12 bzw. 15 also tatsächlich eine gegenüber dem  $^{14}\text{C}$ -background erhöhte Markierung durch  $^3\text{H}$ -Leucin auf. Daraus

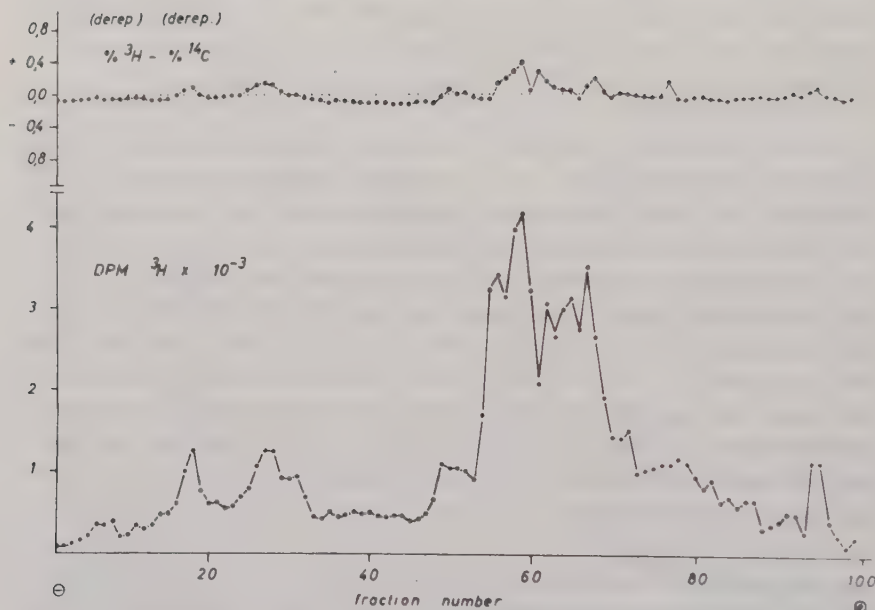


Abb. 18

Analyse einer SPAGE-Auftrennung Kontroll-markierter löslicher Proteine von *Neurospora*;  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -markierte Hälfte der Kultur einheitlich ausgehungert.

Untere Kurve:  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster;  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster nicht wiedergegeben;

Obere Kurve: Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ -Aktivität/Fraktion und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität/Fraktion

kann geschlossen werden, daß diese beiden Proteine eine erhöhte Syntheserate in  $^3\text{H}$ -markierten, ausgehungerten Zellen im Vergleich mit den entsprechenden Proteinen von Glucose-reprimierten,  $^{14}\text{C}$ -markierten Zellen besitzen. Umgekehrt kann man schließen, daß die beiden löslichen Proteine in Abb. 17 mit ihren Radioaktivitätsmaxima in Fraktion 19 bzw. 22, die durch ein Überwiegen der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität gekennzeichnet sind, eine erhöhte Syntheserate in Glucose-ernährten Zellen gegenüber ausgehungerten Zellen aufweisen.

14      Analyse differentiell doppelmarkierter Proteine  
des P 150 000

Abb. 19 zeigt das  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster und die Linie des Differenzbetrages der prozentualen  $^3\text{H}$ - und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität pro Gelfraktion in einer Auftrennung von in Lösung gebrachten Proteinen des an Zellmembranvesikeln reichen P 150 000 von Neurospora ( $^3\text{H}$ -markierte Proteine in dereprimierten und  $^{14}\text{C}$ -markierte Proteine in reprimierten Zellen synthetisiert). Unter den nahezu 30 im Gel aufgetrennten markierten Proteinbanden des P 150 000 ist im Gegensatz zu den löslichen Proteinen von Neurospora keines zu finden, das durch eine über den  $^{14}\text{C}$ -background gesteigerte  $^3\text{H}$ -Radioaktivität auffällt, was auf eine erhöhte Sytheserate dieser Spezies in aushungernden Zellen im Vergleich mit Glucose-reprimierten Zellen hindeuten würde. Keines der im P 150 000 enthaltenen Zellmembranproteine entspricht also in der Regulation seiner Synthese in vivo dem dargestellten Regulationsmuster des GTS II in vivo.

Dies bedeutet, daß die mit der hier angewandten Methode im P 150 000 angereicherten Plasmamembranen von Neurospora keine von den durch Aushungierung in ganzen Zellen dereprimierbare(n) Komponente(n) des GTS II integriert enthalten.

Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben:

Eine erste Deutung wäre, daß die in aushungernden Neurospora-Zellen dereprimierbaren, für die Glucoseaufnahme Geschwindigkeits-bestimmenden Komponenten des GTS II auch in vivo nicht

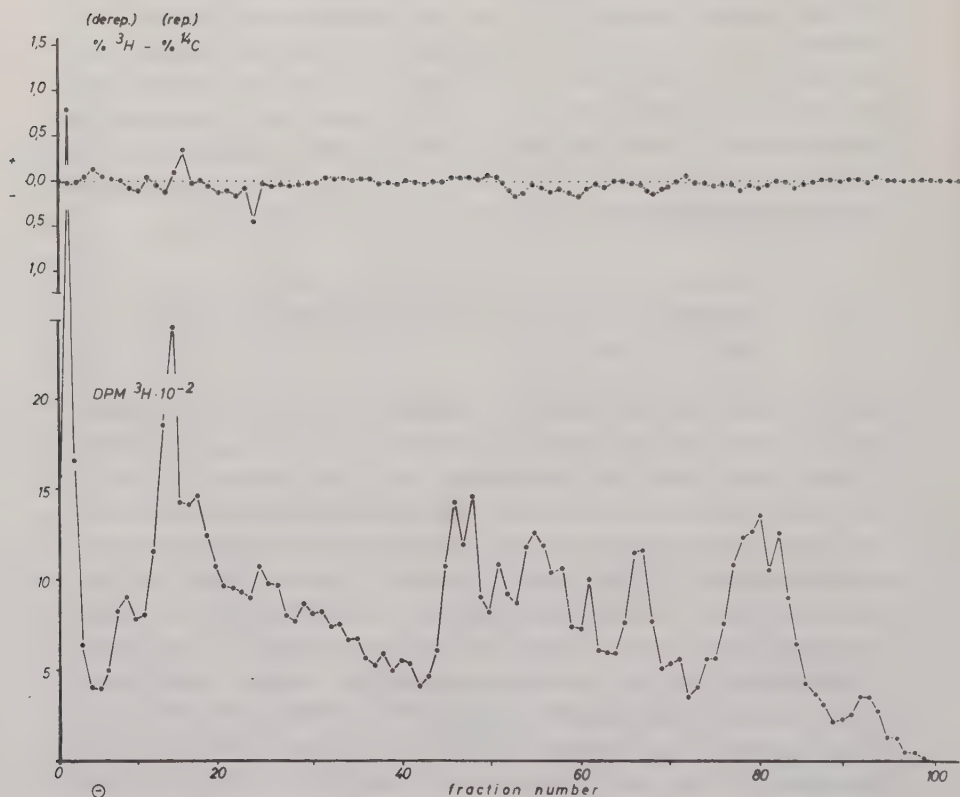


Abb. 19

Analyse einer SPAGE-Auftrennung differentiell doppelmarkierter Proteine des P 150 000 von *Neurospora*;  $^3\text{H}$ -markierte Hälfte der Kultur ausgehungert,  $^{14}\text{C}$ -markierte Hälfte der Kultur Glucose-reprimiert.

Untere Kurve:  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster,  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster nicht wiedergegeben;

Obere Kurve: Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ -Aktivität/Fraktion und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität/Fraktion.

in die Zellmembran integriert werden, sondern als lösliche Proteine im Cytoplasma oder im periplasmatischen Raum lokalisiert sind. Diese Annahme kann sich auf Beispiele bei bakteriellen Zucker-Transport-Systemen stützen. Bei dem in der Einleitung erwähnten PTS-System, mit dem die meisten Bakterien die für sie wesentlichen Zucker aufnehmen, wurden zwei Proteine beschrieben (Enzym I und HPr-Protein) (Kaback, H. R., 1970 b), die als wesentliche Bestandteile des Transport-Systems dennoch nicht in der Zellmembran der Bakterien, sondern als lösliche Proteine im Cytoplasma zu finden sind.

Als alternative Deutung kann angenommen werden, daß die GTS II-Komponente in vivo wohl an die Plasmamembran angelagert oder im periplasmatischen Raum zwischen Membran und Zellwand lokalisiert ist, aber während des Zellaufschlusses und der Präparation der Membranvesikel zum größten Teil abdissoziiert und in Lösung geht.

Um dieser Deutung nachzugehen, wurde nun als weitere Zellfraktion die differentiell doppelmarkierte Fraktion der Schockproteine auf induzierbare Komponenten hin untersucht. Wie unter C.11 erwähnt, schien diese Gruppe von Proteinen schon wegen des erbrachten Nachweises von Glucose-Bindungsaktivität (Hack, A., 1974) für die Identifizierung von GTS II-Komponenten besonders interessant.

#### 15 Analyse differentiell doppelmarkierter Schockproteine

Zur Gewinnung differentiell doppelmarkierter Schockproteine wurde eine Hälfte einer in Glucose angekeimten Zellpopulation durch Aushungerung im GTS II dereprimiert und währenddessen 15 Minuten lang mit  $^3\text{H}$ -Leucin markiert. Die andere, weiterhin Glucose-reprimierte Hälfte dieser Population, wurde in derselben Zeit durch  $^{14}\text{C}$ -Leucin markiert. Nach Vereinigung beider Populationen wurden nach B.9.1 Schockproteine daraus gewonnen.

Abb. 20 zeigt das  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster und die Linie des Differenzbetrages der prozentualen  $^3\text{H}$ - und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität pro Gelfraktion in einer Auftrennung der Schockproteine von Neurospora. Bei den ersten 10 Fraktionen dieses

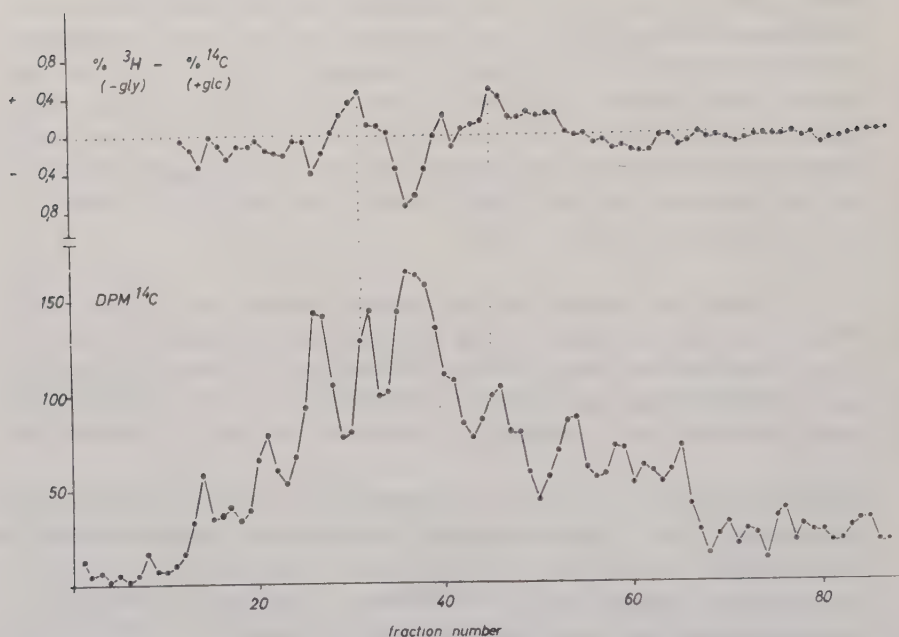


Abb. 20

Analyse einer SPAGE-Auftrennung differentiell doppelmarkierter, durch osmotischen Schock isolierter peripherer Zellwand- und Zellmembranproteine;  $^3\text{H}$ -markierte Hälfte der Kultur dereprimiert im GTS II durch Aushungerung,  $^{14}\text{C}$ -markierte Hälfte der Kultur Glucose-reprimiert.

Untere Kurve:  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster;  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster nicht wiedergegeben.

Obere Kurve: Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ -Radioaktivität/Fraktion und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität/Fraktion.

Geles mit minimaler Radioaktivität war eine gesicherte Angabe des Nuklidverhältnisses nicht möglich. In den weiteren Fraktionen sind jedoch unter den etwa 20 im Gel aufgetrennten, markierten Schockproteinen in Abb. 20 mindesten zwei zu finden, die durch eine, auch in Wiederholungsgelen gut reproduzierbare, gegenüber dem  $^{14}\text{C}$ -background gesteigerte prozentuale  $^3\text{H}$ -Radioaktivität auffallen. Sie liegen im Gel in der jeweils linken Schulter der Proteinbanden mit ihren Radioaktivitätsmaxima in den Fraktionen 32 bzw. 45 und sind durch die lotrechte punktierte Linie gekennzeichnet. Diese beiden Proteine werden wie das GTS II bevorzugt in ausgehungerten Neurosporangien synthetisiert und reprimiert in Glucose-gehaltenen Zellen.

Mindestens ein Schockprotein zeigt umgekehrt eine sehr ausgeprägte präferentielle Markierung durch  $^{14}\text{C}$ -Leucin (Radioaktivitätsmaximum in Fraktion 36), es wird also in ausgehungerten Neurosporangien reprimiert und nur in Glucose-gehaltenen Zellen synthetisiert.

Diese beiden dereprimierbaren Proteine wurden in der Fraktion der Schockproteine gefunden, stammen also entweder von der Zellwand, dem periplasmatischen Raum oder von der Zellmembran, sicherlich jedoch nicht aus dem Cytoplasma der Zellen. Aus ihrer Herkunft und aus der Tatsache, daß sie wie das GTS II nur in ausgehungerten Zellen synthetisiert werden, könnte man die Annahme ableiten, daß diese beiden Schockproteine Komponenten des GTS II darstellen.

Es ist jedoch nicht gerechtfertigt anzunehmen, daß in der Neurosporangie durch Aushungerung nur für den Glucose-Transport bestimmte Proteine synthetisiert würden. Auch wenn wie hier durch die selektive Methode der Isolierung von Schockproteinen die meisten zellulären Proteine von Neurospora aus der Analyse ferngehalten werden, ist mit GTS II-unspezifischen, ebenfalls durch Aushungerung dereprimierbaren Proteinen zu rechnen, worauf in der Diskussion noch näher eingegangen wird. Zur Unterscheidung zwischen GTS II-unspezifischen Proteinen und den gesuchten Komponenten bietet ein bei der Darstellung der Regulation des GTS II genannter Befund einen Ansatzpunkt. Unter C.2 war gezeigt worden, daß ein Wechsel der Glucose-angekeimten Neuro-

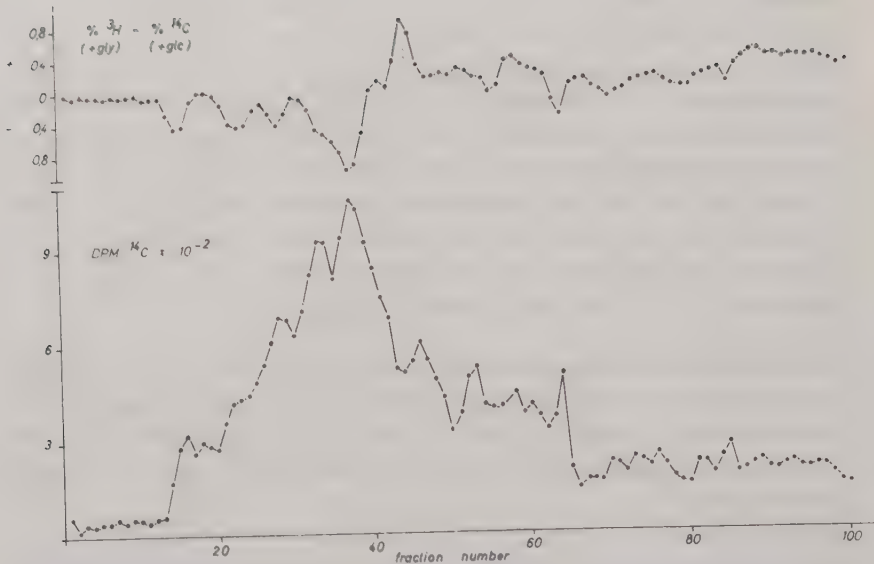


Abb. 21

Analyse einer SPAGE-Auftrennung differentiell doppelmarkierter Schockproteine;  $^3\text{H}$ -markierte Hälfte der Kultur dereprimiert im GTS II durch Weiterkeimung in Glycerin,  $^{14}\text{C}$ -markierte Hälfte der Kultur Glucose-reprimiert.

Untere Kurve:  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätsmuster;  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätsmuster nicht wiedergegeben;

Obere Kurve: Differenz der prozentualen  $^3\text{H}$ -Aktivität/Fraktion und der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität/Fraktion.

sporazellen von Glucose- in Glycerin-Medium ebensogut eine maximale Derepression des GTS II bewirkt wie eine Aushungerung. Diese Steigerung der GTS II-Aktivität tritt ein, obwohl die Zellen Glycerin als Kohlenstoffquelle gut verwerten können, also nicht unter den Bedingungen einer Aushungerung stehen. Glucose-angekeimte Zellen zeigen nach Umsetzen in Glycerin-Medium wie Glucose-weitergekeimte Zellen eine exponentielle Zunahme des  $O_2$ -Verbrauches. Wie aus Abb. 6 zu ersehen war, nahm die Atmung der Glycerin-gekeimten Zellen jedoch nur halb so schnell zu wie die Atmung der Glucose-gekeimten Zellen. Auf den möglichen Einwand, daß sich Glycerin-gehaltene Zellen nicht wesentlich von ausgehungerten Zellen unterscheiden, soll nach Erheben weiterer Befunde am Ende dieses Abschnittes eingegangen werden.

Unter der Annahme, daß die GTS II-unspezifischen Reaktionen der ausgehungerten Neurosporazelle in einer auf Glycerin wachsenden Zelle ausbleiben, wurde ein weiteres Markierungsexperiment mit dem Ziel unternommen, GTS II-spezifische Proteine während ihrer Neusynthese nach Überführung Glucose-angekeimter Zellen in Glycerinmedium zu markieren. Die eine Hälfte einer in Glucose angekeimten Zellpopulation war diesmal nicht durch Aushungerung, sondern durch Umsetzen in Glycerin-Medium im GTS II dereprimiert worden und währenddessen 15 Minuten lang mit  $^3H$ -Leucin markiert worden. Die andere, weiterhin Glucose-reprimierte Hälfte dieser Population, wurde in derselben Zeit durch  $^{14}C$ -Leucin markiert. Nach Vereinigung beider Populationshälften wurden die Schockproteine daraus gewonnen.

Abb. 21 zeigt das  $^{14}C$ -Radioaktivitätsmuster und die Linie des Differenzbetrages der prozentualen  $^3H$ - und der prozentualen  $^{14}C$ -Radioaktivität pro Gelfraktion in einer Auftrennung der Schockproteine von Neurospora, die nach der oben angegebenen Weise differentiell doppelmarkiert worden waren. Die Bandenabstände der einzelnen radioaktiven Proteine sind in diesem Gel kleiner als in der entsprechenden Abb. 20, dennoch sind die homologen radioaktiven Proteinbanden beider Auftrennungen unschwer zu erkennen.

Unter den in diesem Gel aufgetrennten Schockproteinen fällt nun eines durch seine gegenüber dem  $^{14}C$ -background besonders deut-

lich gesteigerte prozentuale  $^3\text{H}$ -Radioaktivität auf. Es liegt im Gel in der linken Schulter der Proteinbande mit dem Radioaktivitätsmaximum in der Fraktion 46 und ist in der Abbildung wieder durch eine lotrechte punktierte Linie gekennzeichnet. Dieses Protein wird, wie das GTS II in Zellen reprimiert, die die ganze Zeit über in Glucose-Medium gehalten wurden, jedoch synthetisiert in Zellen, die von einem Glucose-Medium auf ein Glycerin-Medium zur Weiterkeimung umgesetzt worden waren. Mehrere Schockproteine zeigen umgekehrt eine präferentielle Markierung durch  $^{14}\text{C}$ -Leucin. Am deutlichsten ist dies bei dem Protein mit dem Radioaktivitätsmaximum in Fraktion 37 ausgeprägt. Diese Proteine werden also nur in Glucose-gehaltenen Zellen synthetisiert und in Glycerin-gehaltenen Zellen reprimiert.

Beim Vergleich der Ergebnisse der in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten verschiedenen Markierungsexperimente finden sich Übereinstimmungen und Unterschiede, die reproduzierbar waren in Wiederholungshelen mit Proteinen aus der selben Präparation. Übereinstimmend wird in beiden Versuchen das Glucose-reprimierbare Protein mit dem kleineren Molekulargewicht (Fraktion 45 bzw. 46) in ausgehungerten sowie in Glycerin-gekeimten Zellen dereprimiert. Weiterhin zeigt sich in beiden Versuchen übereinstimmend, daß das auffällige Glucose-induzierbare Protein der Fraktion 36 bzw. 37 sowohl in ausgehungerten Zellen als auch in Glycerin-gekeimten Zellen gar nicht oder weniger stark synthetisiert wird als in Glucose-gekeimten Zellen.

Als Unterschied zwischen beiden Versuchen fällt vor allen Dingen auf, daß das Glucose-reprimierbare Protein mit dem größeren Molekulargewicht in der Fraktion 32 der Abb. 20 nur in ausgehungerten Zellen, nicht jedoch in Glycerin-gekeimten Zellen dereprimierbar war. Weiterhin scheint in Glycerin-gehaltenen Zellen eine Reihe von Proteinen mit kleinerem Molekulargewicht (Fraktion 13 - 30) reprimiert zu werden, was in ausgehungerten Zellen nicht beobachtet wurde.

An Hand der in Abb. 20 und 21 dargestellten Befunde soll der Einwand diskutiert werden, daß Glycerin-gekeimte Zellen sich womöglich nicht wesentlich von ausgehungerten Zellen unterscheiden. Die Übereinstimmungen, die in den beiden unterschiedlichen Mar-

kierungsexperimenten gefunden wurden, sind vereinbar mit diesem Einwand. Wenn durch Glycerin-Haltung ebenso wie durch Aushungierung der Zellen im Vergleich zu Glucose-gehaltenen Zellen das Protein der Fraktion 45 bzw. 46 dereprimiert und das Protein der Fraktion 36 bzw. 37 reprimiert wird, so könnte dies tatsächlich dadurch bedingt sein, daß von Glucose auf Glycerin umgesetzte Zellen sich langsam an diese neue Kohlenstoffquelle adaptieren und dabei aushungern.

Die dargestellten Unterschiede zwischen beiden Markierungsexperimenten jedoch können den zitierten Einwand zumindestens teilweise widerlegen. So kann man nun durch die Glycerin-Derepression die beiden Glucose-reprimierbaren, durch Aushungierung dereprimierbaren Proteine bezüglich ihrer Zugehörigkeit zum GTS II gesondert bewerten. Das Protein mit dem kleineren Molekulargewicht scheint ein GTS II-unspezifisches Protein zu sein, welches für andersartige, nicht mit der Verstärkung der Glucoseaufnahme zusammenhängende Vorsorgemaßnahmen in aushungernden Zellen dereprimiert wird. Das kann daraus geschlossen werden, daß dieses Protein in Glycerin-ernährten Zellen im Gegensatz zum GTS II nicht dereprimiert wird. Das Glucose-reprimierbare Protein mit dem größeren Molekulargewicht dagegen weist durch seine gleichzeitige Dereprimierbarkeit in Glycerin- und Aushungerungs-Medium eine auffällige Ähnlichkeit in seinem Regulationsmuster mit dem Regulationsmuster des GTS II auf. Dieser Befund kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß dieses Protein möglicherweise als dereprimierbare, Geschwindigkeits-bestimmende Komponente des GTS II angesehen werden kann.

## D. Diskussion

Die in biologischen Membranen integrierten Transport-Systeme ermöglichen den selektiven und gerichteten Fluß der verschiedensten Substrate, wie etwa den Stoffaustausch mit dem Außenmedium oder auch den Stoffaustausch zwischen den einzelnen Kompartimenten der Zelle. Ein Beispiel für ein nach dem Außenmedium hin orientiertes Transportsystem liefert das in der vorliegenden Arbeit beschriebene GTS II.

Die Existenz spezifischer Transport-Systeme führte zu der Frage nach ihrer Struktur und Arbeitsweise. Die Analyse von Einzelkomponenten Membran-gebundener Funktionen, wie sie Transport-Systeme darstellen, stieß jedoch in den meisten Fällen auf Schwierigkeiten. Hinzu kam noch, daß für Transport-Systeme, außer für Permeasen mit enzymatischer Aktivität (group translocation), keine in vitro-Testmöglichkeiten bestehen. Aus diesen Gründen beschränkten sich für viele Jahre die Untersuchungen auf Aufnahmeexperimente mit ganzen Zellen. Die Messung der influx- und efflux-Raten bei verschiedenen Substratkonzentrationen und bei verschiedenen Stoffwechselbedingungen sowie eine Vielzahl anderer Versuche ermöglichten jedoch bereits die Aufstellung sehr detaillierter Modelle für die einzelnen Transport-Systeme.

Diese Art der Analyse an intakten Zellen wurde im Teil I der vorliegenden Arbeit über das GTS II von *Neurospora* unternommen mit dem Ziel, Einsicht in den Mechanismus der Regulation des Systems und in seine Energieversorgung zu gewinnen.

Bei der genaueren Untersuchung der Aushungerungs-bedingten Stimulierung der GTS II-Aktivität zeigte sich, daß die Antwort Glucose-angekeimter Zellen auf einen Entzug der Glucose aus dem Medium zweifacher Natur ist. Durch die Aushungerung wird die Affinität ( $K_m$ ) des GTS II um den Faktor 3 erhöht und gleichzeitig die maximale Transportrate ( $V_{max}$ ) des Systems um den Faktor 5 angehoben (Doxiadis, I., 1976).

Die Erhöhung der Affinität des GTS II könnte indirekt durch Veränderungen der Lipoprotein-Umwelt der einzelnen Carrier-moleküle während der Aushungerung der Zellen hervorgerufen worden sein. In Betracht zu ziehen sind hier Umgruppierungen oder Neusynthesen einzelner Membrankomponenten, wie etwa von Inositol-phosphatiden. Inositol war als ein für die Funktion des GTS II nötiger Faktor identifiziert worden (Scarborough, G., 1971).

Die Erhöhung der Affinität des GTS II für 3-O-mglc könnte andererseits auch durch Effektoren bedingt sein, die direkt am Carrierprotein angreifen wie z. B. Protonen. Bei dem Hexose-Transport-System von Chlorella (Komor, E.; Tanner, W., 1974) und bei dem Phosphat-Transport-System von Neurospora (Lowendorf, H. S. et al. 1974) sind pH-gesteuerte Affinitätsveränderungen gefunden worden. Bei beiden Systemen wird angenommen, daß der Carrier im Außenmedium eher in einer protonierten, hochaffinen Form und im alkalischeren Innenmedium eher in einer unprotonierten, niederaffinen Form vorliegt.

Eine Prüfung der interessanten Frage, ob auch beim GTS II von Neurospora Protonen als Effektoren die Affinität des Carriers zum Substrat steigern, steht noch aus. Wenn dem so wäre - und als Hinweis dafür kann mindestens das auffallend im sauren Bereich (pH 4,75) liegende pH-Optimum des GTS II gewertet werden (Klingmüller, W.; Huh, H., 1972) - dann könnte man diskutieren, ob die niedrige Affinität des GTS II von Glucose-reprimierten Zellen etwa auf einer niedrigeren Aktivität der postulierten Protonen-Pumpe, also einer niedrigeren Protonenkonzentration dieser Zellen auf der Membranaußenseite beruht. Im folgenden wird dieser Gedanke noch einmal aufgegriffen werden.

Im Zusammenhang mit der festgestellten Erhöhung der maximalen Transportrate ( $V_{\max}$ ) des GTS II um den Faktor 5 nach einer Aushungerung der Zellen stellte sich die Frage, ob die hierdurch angezeigten zusätzlich einsatzbereiten Komponenten des GTS II nach Neusynthese oder nach Befreiung von einer etwaigen Substrat-hemmung aktiv werden konnten. Der Befund der gleichbleibenden

GTS II-Aktivität von Neurosporazellen während einer Aushungierung in CHX-haltigem Medium (Abb. 7, Teil B) ist mit der Annahme eines feedback-Regulationsmodelles auf Proteinebene, bei dem die volle Aktivität des GTS II erst nach Senkung des intrazellulären Glucosespiegels erreicht werden sollte, nicht vereinbar.

Der Nachweis der Neusynthese der Geschwindigkeits-bestimmenden Komponenten des GTS II (welche Funktion auch immer sie haben) konnte durch das in Abb. 7 wiedergegebene Experiment erbracht werden, welches von anderen Autoren (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 c) konzipiert und hier verändert reproduziert wurde. Die Vorstellung der Neusynthese von GTS II-Komponenten stützt sich vor allem auf den Befund, daß in CHX-haltigem Medium ausgehungerte Zellen in einer Nachbehandlung in CHX-freiem Medium das GTS II zur Ausprägung bringen, und das auch wenn es Glucose enthält. Dieses Ergebnis wurde als Akkumulation GTS II-spezifischer m-RNS während der CHX-Aushungierung gedeutet. Diese Akkumulation GTS II-spezifischer m-RNS in CHX-haltigem Medium gelingt nur, wenn dieses Glucose-frei ist, nicht jedoch, wenn ihm Glucose zugesetzt ist. Daraus kann abgeleitet werden, daß Glucose auf der Ebene der DNS die Transkription GTS II-spezifischer m-RNS unterbindet.

Für die zusätzliche Annahme einer Glucose-gesteuerten Translations-Repression der GTS II-Neusynthese, wie sie für manche Funktionen von Eukaryontenzellen wahrscheinlich gemacht werden konnte (Tomkins, G. M. et al., 1969), sprechen bisher keinerlei Befunde, es sei denn, man wollte den unter C.4.2 dargestellten Widerspruch zwischen der Uridin-Einbau-Hemmung durch Rifampicin und der Rifampicin-Insensibilität der GTS II-Derepression durch ein solches Modell erklären. Die Postulierung einer stabilen GTS II-spezifischen m-RNS, die in ihrer Translationsrate selektiv durch Glucose, nicht aber durch Rifampicin reprimierbar wäre, verbietet sich jedoch schon wegen des erwähnten Befundes, daß Glucose die Realisierung der vor CHX-akkumulierten GTS II-spezifischen m-RNS nicht verhindert, sondern zuläßt.

Die unter C.4.1 angesprochene irreversible Inaktivierung des GTS II von dereprimierten Zellen durch Glucose, die weit über den normalen turnover des Transportsystemes in Glucose-freiem Medium hinausgeht,

ist neben der Gen-Repression eine weitere Möglichkeit der Neurospora-Zelle, die aktive Glucose-Aufnahme in Glucose-reichem Medium rasch zu drosseln. Dies geschieht wohl durch chemische Modifizierung des Carriers oder anderer Geschwindigkeits-bestimmender Komponenten. Die gezielte irreversible Inaktivierung einer Proteinspezies unter tausenden unbeeinträchtigten Proteinen ist ein erstaunlicher Prozeß. Auf die Frage, wie die Zelle die notwendige Präzision der Inaktivierung erreicht, gibt es hier im Falle des GTS II, wie in den meisten anderen entsprechenden Beispielen noch keine befriedigende Antwort.

Mit dem Ziel, Einsicht zu erhalten in den molekularen Mechanismus der Transkriptions-Derepression des GTS II wurde in Anlehnung an die zitierten Arbeiten bei Prokaryonten und Eukaryonten, die Wirkung von c-AMP auf die GTS II-Regulation untersucht. Es zeigte sich hier, ebenso wie bei entsprechenden Experimenten bei *Aspergillus*, bei denen versucht wurde, die Glucose-Repression des Prolin-Transport-Systems und der Prolin-Oxydase durch Zugabe von c-AMP aufzuheben (Arst, H. N.; MacDonald, D. W., 1975), daß der in vivo wirksame Effektor bei der Derepression des GTS II von *Neurospora* bzw. bei der Derepression der genannten Funktionen in *Aspergillus* offenbar nicht c-AMP sein kann. Eine Zugabe von c-AMP bzw. seines Dibutyryl-Derivates zu reprimierten Zellen bewirkte in keinem Falle eine Derepression. Beim GTS II von *Neurospora* wurde darüberhinaus unter dereprimierenden Bedingungen (Aushungierung) durch c-AMP auch die Neusynthese des GTS II verhindert, was im übrigen den Einwand entkräftet, das Molekül zeige keine dereprimierende Wirkung, da es nicht in die Zelle eindringen könne. Zur Erklärung dieses Befundes war von uns postuliert worden, daß nach c-AMP-Zugabe zu aushungernden Zellen die sonst ablaufende GTS II-Derepression deshalb unterbleibt, weil c-AMP in vivo - wie für *Neurospora*-Extrakte in vitro nachgewiesen (Tellez-Inon, M. T.; Torres, H. N., 1970) - durch Stimulierung der Glycogenolyse eine hohe intrazelluläre Glucosekonzentration hervorruft.

Dieser Erklärungsvorschlag macht jedoch nur die unerwartete Hemmung der GTS II-Derepression während der Aushungierung in c-AMP-haltigem Medium klar. Als weiteren Befund dieses Experimentes gilt es daneben festzuhalten, daß c-AMP bei dem Glucose-reprimierbaren GTS II von *Neurospora* eine grundsätzlich andere Wirkung zeigt

als beider Repression der Glucose-reprimierbaren Funktionen von E.coli wie z. B. der  $\beta$ -Galactosidase. Bei E.coli weiß man, daß eine Zugabe von Glucose in das Medium die intrazelluläre c-AMP-Konzentration senkt (Makman, R. S.; Sutherland, E. W., 1965) und zwar dadurch, daß Glucose in den Zellen die c-AMP-Produktion durch Hemmung des Enzymes Adenylatcyclase drosselt (Peterkovsky, A.; Gazdar, C., 1974). Diese Senkung des intrazellulären c-AMP-Spiegels bewirkt nun ein koordiniertes Aussetzen der Transkription einer ganzen Reihe von Glucose-reprimierbaren Genen. Die Initiation der Transkription an den Promotoren dieser Gene kann nur bei ausreichender c-AMP-Konzentration erfolgen unter Mitwirkung von einem heute schon gereinigt vorliegenden c-AMP-bindenden Protein (catabolit gene activator protein = cap) (Zubay, G. et al. 1970). Bei Neurospora ist dieser molekulare Mechanismus im Falle der Transkriptionsregulation des GTS II nach unseren Ergebnissen entweder nicht zutreffend, oder von sekundären Wirkungen des c-AMP überlagert.

Bei dem Schimmelpilz Aspergillus liegen erste sehr interessante genetische Daten über den Mechanismus der Glucose-Repression des Prolin-Transport-Systems und der Prolin-Oxidase vor (Arst, H. N.; MacDonald, D. W., 1975). Man kennt hier ein Gen, dessen rezessive Mutation ( $cre A^d$  = carbon catabolit repression) zur Derepression Glucose-reprimierbarer Funktionen der Zelle auch in Glucose-haltigem Medium führt. Von diesem Gen nimmt man an, es könne einen Repressor codieren. Als ein mögliches, Katabolit-Repressor-bindendes Operatorgen kann hier das in  $prn^d$ -Mutanten betroffene Gen betrachtet werden, das zwischen den eng gekoppelten Genen  $prn A$  (Prolinoxidase) und  $prn B$  (Prolin-Aufnahme) lokalisiert ist. Dieses Gen führt im mutierten Zustand zu einer Derepression der beiden Glucose-reprimierbaren Nachbargene auch in Glucose-haltigem Medium. Sein Einfluß auf die Nachbargene ist - wie für ein Operatorgen zu fordern - nur in Cis- und nicht in Trans-Stellung zu beobachten. Die Autoren glauben, daß durch die hier bei Aspergillus erhobenen Befunde zu ersten Male ein nach dem bakteriellen Operonmodell strukturiertes Gen-cluster bei Eukaryonten wahrscheinlich gemacht wurde.

Unter den  $sor^r$ -Mutanten von Neurospora war ein Stamm aufgefallen ( $sor^r 6$ ), der in Glucose-haltigem Medium nicht wie der Wildtyp

die GTS II-Aktivität verminderte, sondern vielmehr erhöhte. Unter Umständen liegt bei dieser Mutante, die vermutlich im Glucose-Repressionsmechanismus des GTS II betroffen ist, ein vergleichbarer Defekt wie bei der erwähnten cre A-Mutante von *Aspergillus* vor.

Zur Abklärung der Annahme, daß in der Mutante  $sor^r 6$  ein zur Glucoserepression mehrerer Gene nötiger Repressor defekt ist, wäre es interessant, das zeitliche Regulationsmuster anderer Glucose-reprimierbarer Funktionen, wie z. B. des Galactose-, Fructose- oder des Lactose-Transport-Systems in diesem Stamm zu untersuchen.

Bei dem Versuch den Transkriptions-Repressions-Mechanismus der Neurospora-Zelle zu verstehen, mit dem sie die aktive Glucose-Aufnahme steuert, erschienen Überlegungen über die Funktion der dereprimierbaren, Geschwindigkeits-bestimmenden Komponente des GTS II angebracht. Es war zu fragen, ob durch eine Aushungerung der Neurospora-Zellen wirklich der Glucose-Carrier des GTS II dereprimiert wird oder ob vielmehr etwa die für den Energie-input verantwortliche Protonenpumpe zur Neusynthese gelangt und dadurch die GTS II-Aktivität gesteigert wird. Eine Klärung war auch wegen der in Teil II der vorliegenden Arbeit angestrebten Versuche zur Isolierung dieser dereprimierbaren Komponente wichtig.

Für die Annahme, daß nicht der Carrier selbst, sondern ein für den Energie-input verantwortliches Protein in aushungernden Zellen dereprimiert wird, sprechen zwei Befunde: Bei dem Vergleich von reprimierten und dereprimierten Zellen fällt als Unterschied auf, daß in dereprimierten Zellen ca. 230 mV und in reprimierten Zellen nur ca. 170 mV als Ruhepotential gemessen wurden (Slayman, C. L.; Slayman, C. W., 1974). Dieser zwar nicht durch statistische Angaben abgesicherte Unterschied würde gut zu der Vorstellung passen, daß sich dereprimierte Zellen durch Bereitstellung eines höheren und schneller rekonstituierten Protonengradienten von reprimierten Zellen unterscheiden.

Weiterhin wurde gefunden, daß durch die Aushungerung nicht nur das GTS II, sondern auch andere Zucker-Transport-Systeme wie das Fructose-, Galactose- und Lactose-Transport-System in ihrer Aktivität gesteigert werden (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 b). Auch dieser Befund wäre erklärbar durch eine Dereprimierbarkeit einer allen vier Transport-System gemeinsamen, für den Energie-input verantwortlichen Komponente.

Nicht vereinbar mit dieser Annahme sind jedoch die Befunde, daß auch vom Energiestoffwechsel der Zelle unabhängige Vorgänge wie Glucose-efflux und Glucose-Gegentransport in weit stärkerem Maße bzw. überhaupt nur in dereprimierten Zellen und nicht in reprimierten Zellen zu beobachten sind (Abb. 10 und 11). Würde die obige Annahme zutreffen, so sollten sich im GTS II dereprimierte Zellen nach Hemmung ihres Energiestoffwechsels in efflux und Gegentransport nicht von reprimierten Zellen unterscheiden.

Aus dem beobachteten, GTS II-katalysierten Gegentransport kann eine weitere wichtige Eigenschaft des untersuchten hochaffinen, dereprimierbaren Glucose-Transport-Systems abgeleitet werden. Gegentransport kann wie erwähnt nur bei Transport-Systemen beobachtet werden, bei denen sich eine Substrat-bindende Membrankomponente von der einen Seite der Membran (Außenmedium) zur anderen (Innenmedium) bewegt bzw. abwechselnd auf der einen oder der anderen Seite der Membran für die Substratbindung frei liegt (bei Rotation des Carriers). Gegentransport kann jedoch nicht erwartet werden bei Transport-Systemen, bei denen die Substratmoleküle von einer fest fixierten Bindungsstelle an der Membranaußenseite zu einer anderen fixierten Bindungsstelle an der Membraninnenseite springen, wie es bei Transport-Systemen mit Poren- oder Kanalcharakter postuliert wird (Kotytk, A.; Janacek, K., 1970). Ein solcher Poren-Mechanismus wird z. B. für den elektrisch gesteuerten  $\text{Na}^+$ -Kanal der Nerven-Zellmembran angenommen. In künstlichen Lipidmembranen können  $\text{Na}^+$ -Poren durch Zugabe der antibiotisch wirksamen Substanz Gramicidin aufgebaut werden (Bamberg, E. et al., 1974).

Aus dem von uns beim GTS II von Neurospora nachgewiesenen Gegentransport (Abb. 11) ist demnach zu schließen, daß hier Glucose durch einen in der Membran mobilen Carrier in die Zelle

eingeschleust wird und nicht etwa durch Membran-Poren.

Zur Erklärung der Carrier-vermittelten Substratanreicherung in Zellen von Mikroorganismen wurde von Mitchell (Mitchell, P., 1967) eine Abwandlung der chemiosmotischen Hypothese über die Energiegewinnung in den Mitochondrien vorgebracht. Experimentelle Befunde, die diese in Abb. 12 B schematisch wiedergegebene chemiosmotische Hypothese des Aktiven Transportes stützen, wurden bei Prokaryonten und Eukaryonten erhoben. Bei der Untersuchung des Hexose-Transport-Systems der Grünalge *Chlorella vulgaris* etwa wurde gefunden, daß die Zugabe von 6-Desoxy-Glucose zu den Algenzellen eine rasche, vorübergehende Alkalisierung des Außenmediums (Komor, E., 1973) hervorruft. Die Geschwindigkeit, mit der diese Alkalisierung auftrat, war abhängig von der zugegebenen Substratkonzentration und zeigte Sättigungsverhalten, was die Ermittlung einer Michaelis-Menten-Konstante für diesen Vorgang erlaubte ( $K_m = 3 \times 10^{-4}$  M). Der so ermittelte  $K_m$ -Wert der Substrat-induzierten Alkalisierung des Außenmediums stimmt mit dem  $K_m$ -Wert des Hexose-Transport-Systems für 6-Desoxy-Glucose überein.

Ähnliche Ergebnisse wurden am GTS II von *Neurospora* erarbeitet (Slayman, C. L.; Slayman, C. W., 1974). Die Autoren wählten zur Überprüfung der chemiosmotischen Hypothese des Aktiven Transportes mit Bedacht das GTS II von *Neurospora*, da dieses Transport-System im Vergleich zu anderen Systemen bei weitem die höchsten maximalen Transportraten aufweist und so am ehesten die geringen, mit dem Transportvorgang zusammenhängenden Ionenverschiebungen wahrgenommen werden können. *Neurospora* schien in diesem Zusammenhang weiter ein besonders geeignetes Objekt zu sein, daß direkte Messungen des Membranpotentials bis heute bei Bakterien- oder Hefe-Zellen nicht möglich sind. Die langen Hyphenzellen von *Neurospora* jedoch erlaubten den Autoren eine direkte Ableitung der Membranpotentialdifferenz zwischen Zellplasma und Zelläußerem mit Hilfe von Elektrolyt-gefüllten Glaskapillaren, wie sie in der Neurophysiologie zur Ableitung von Aktionspotentialen einzelner Nervenzellen verwendet werden. Nach Zugabe von Glucose bzw. 3-O-mglc zu angekeimten, reprimierten *Neurospora*-zellen konnte nur eine geringe Depolarisierung des starken Membranpotentials (-200 mV, innen negativ) gemessen werden, während

eine Zugabe derselben Zucker zu angekeimten und danach ausgehungerten, also im GTS II dereprimierten Zellen, eine sofortige drastische Depolarisierung um maximal 120 mV bewirkte. Das Ausmaß der jeweils erreichbaren Depolarisierung war abhängig von der jeweiligen, den Zellen gebotenen Glucose-Konzentration. Der  $K_m$ -Wert der Glucose-induzierten Depolarisierung (40  $\mu$ M) entsprach auch hier dem  $K_m$ -Wert des GTS II für die Glucose-Aufnahme in dereprimierten Zellen. Diese Befunde und die weiter von den Autoren gemessene und von uns reproduzierte Alkalinisierung des Außenmediums dereprimierter Zellen nach 3-O-mglc-Zugabe (Abb. 12 A) machen auch für das GTS II von *Neurospora* das Vorliegen eines Glucose-Protonen-Symport-Systems wahrscheinlich.

Die Protonen-Symport-Hypothese scheint in manchen Fällen auch auf efflux- und Gegentransport-Vorgänge anwendbar zu sein. Bei *Chlorella* konnte nachgewiesen werden, daß der efflux von Glucose ein Energie-liefernder Prozeß ist. Die durch Hexose-efflux bedingte scheinbare Hexose-Akkumulation (Gegentransport) in den Algenzellen kann unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln, wie bereits erwähnt, durch Entkoppler wie FCCP vollkommen gehemmt werden (Komor, E. et al., 1973). Dieser und andere Befunde wurden hier durch ein Gegentransport-Modell gedeutet, bei dem angenommen wird, daß beim efflux von Hexosen aus der Zelle die in der Gegenrichtung laufende Hexose-Pumpe durch Ausschleusung von Hexose und Protonen einen vom Energiestoffwechsel der Zelle unabhängigen, aber gegen Entkoppler sensiblen Protonengradienten aufbaut. Beim Gegentransport soll dieser durch Ausstrom von z. B.  $^{12}\text{C}$ -Zucker aufgebaute Protonengradient nun zur Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -Zucker aus dem Außenmedium genutzt werden können. Dieser postulierte Vorgang könnte große Bedeutung für die Ökonomie der Zelle bei der Aufrechterhaltung hoher steady-state-Substratkonzentrationen im Zellinneren besitzen, wo influx und efflux sich die Waage halten. Jedes aus der Zelle herausströmende Glucose-Molekül führt nach diesem Modell durch den Cotransport eines Protons zum Aufbau eines efflux-abhängigen Protonengradienten, der wiederum für den influx, also für die Akkumulation des nächsten Glucose-Moleküles in die Zelle genutzt werden kann.

Beim GTS II von *Neurospora* scheint nun entweder die Anwendung des Protonen-Symport-Modelles auf den Glucose-efflux nicht gerechtfertigt zu sein, oder es scheint zumindest ein durch  $^{12}\text{C-3-O-mglc}$ -efflux aufgebauter künstlicher Protonengradient keine notwendige Vorbedingung für einen Gegentransport von  $^{14}\text{C-3-O-mglc}$  zu sein, da hier beim GTS II, wie in Abb. 11 dargestellt, im Gegensatz zu *Chlorella*, Gegentransport auch in Gegenwart eines Entkopplers (FCCP) zu beobachten war.

Von anderen Autoren wurden experimentelle Befunde angeführt, die darauf hindeuten, daß ATP die nötige Energie für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials über den ATPase-katalysierten Aufbau eines Protonengradienten liefert (Scarborough, G., 1976). Bei Messungen des Membranpotentials von *Neurospora* wurde gefunden, daß dieses nach Blockierung der Atmungskette mit derselben Geschwindigkeit zusammenbricht, mit der die intrazelluläre ATP-Konzentration abnimmt. Diese Geschwindigkeit ist mehrmals geringer als die Geschwindigkeit, mit der die Konzentration der Reduktionsäquivalente in der Zelle abnimmt (Slayman, C. L. et al., 1973). Das spricht gegen deren Beteiligung beim Aufbau des Protonengradienten und deutet vielmehr auf einen Einfluß des zellulären ATP-Spiegels auf den Protonengradienten hin.

Im Zusammenhang mit der Frage, ob tatsächlich eine Zellmembran-ATPase als Generator für das Membranpotential, das als direkter Energiespender bei der Akkumulation von verschiedenen Substraten angesehen wird, in Betracht zu sehen ist, sollen hier noch Befunde von Versuchen über die Energetik der aktiven Aufnahme von Nucleotiden und Aminosäuren bei *Schizosaccharomyces pombe* diskutiert werden (Foury, F.; Goffeau, A., 1975). In Zellen, deren mitochondriale ATP-Produktion durch den Atmungsketten-Hemmstoff Antimycin abgeschaltet war und die nur mehr über die Substarketten-Phosphorylierung in der Glycolyse ATP produzierten, gelang es hier, sowohl die aktive Aufnahme von Uridin, als auch die Ausschleusung von Protonen aus der Zelle durch den ATPase-Hemmstoff Dio-9 zu unterbinden. Dio-9, ein Antibiotikum noch unbekannter Struktur, ist ein Inhibitor der verschiedensten ATPasen aus Chloroplasten, Hefemitochondrien und Hefe- sowie Bakterien-

Zellmembranen. Es hemmt jedoch nicht die Produktion glycolytischen ATP's (Delhez, J.; Goffeau, A., 1975).

Wenn nun Dio-9 bei *Schizosaccharomyces pombe* auch in glycolysierenden Zellen sowohl den Aufbau eines Protonengradienten über der Zellmembran als auch die vom Protonengradienten getriebene Uridin-Akkumulation unterbinden, so ist hiermit ein Hinweis für eine direkte Beteiligung einer Zellmembran-ATPase an der Ausschleusung von Protonen aus der Zelle gegeben.

Es sei erwähnt, daß zumindest bei bakteriellen Transport-Systemen ohne group-translocation die Wahl der Modelle zur Deutung der Daten über den Energie-input in das System noch stark umstritten ist. So wird von manchen Autoren der Energie-input in das  $\beta$ -Galactosid-Transport-System von *Escherichia coli* durch ein Protonen-Symport-Modell erklärt, das dem für das GTS II wahrscheinlich gemachten Modell entspricht (Harold, F. M., 1974). Eine andere Gruppe von Autoren meint mit Befunden, die am selben Transport-System erhoben wurden, das Problem des Energie-inputs allein durch Affinitäts-steuernde Konformationsänderungen des Carriers erklären zu können. Der Carrier soll nach diesem Modell selbst Teil der in der Bakterienzellmembran integrierten Atmungskette sein. Die Elektronen der Atmungskette sollen durch den Carrier oder eine eng mit ihm zusammenhängende Komponente fließen und diese(n) durch Oxydation in eine Hochaffinitätsform überführen, bevor sie schließlich auf  $O_2$  übertragen werden. Die Reduktion derselben Komponente auf der Innenseite der Membran soll ihre Substrataffinität wieder erniedrigen und so zu einer Abgabe des Liganden vom Carrier in das Cytoplasma führen (Kaback, H. R., 1972).

Diese an zellfreien Vesikelpräparationen erarbeitete Sicht der Kopplung des Aktiven Transportes durch Redox-Carrier mit dem bakteriellen Energiestoffwechsel ist als konkurrierende Hypothese zu dem erwähnten, von Mitchell vorgeschlagenen chemiosmotischen Modell des Aktiven Transportes zu sehen. Beide bisher unvereinbare Deutungen führen zu eingehenden Diskussionen der jeweils zur Stützung vorgebrachten experimentellen Daten (Harold, F. M. 1974, weiterhin Lombardi, F. J.; Kaback, H. R., 1974).

Die Zellmembran der Eukaryonten ist zum Elektronentransport im Gegensatz zur Bakterienmembran nicht befähigt. Dementsprechend sind Redox-Carrier-Modelle bei Eukaryonten nicht leicht vorstellbar.

Neben den klassischen Transportversuchen mit ganzen Zellen sind in den letzten Jahren auch Berichte über erfolgreiche Isolationsversuche von Transport-Systemen bzw. von Teilkomponenten veröffentlicht worden. Mit Versuchen dieser Art soll Auskunft erhalten werden etwa über die stoffliche Natur von Carriern (reine Polypeptide oder Lipoproteid-Komplexe) oder über postulierte Details von Carrier-Modellen, die auf kinetische Daten von Versuchen mit ganzen Zellen beruhen, etwa eine pH-gesteuerte Umwandlung des Carriers von einer Hochaffinitäts- in eine Niederaffinitätsform. Schließlich wird in günstigen Fällen auch eine Rekonstitution isolierter Transportsysteme in biologische Membranen oder in weniger komplexe künstliche Lipidmembranen angestrebt und auch erreicht (Klingenberg, M. et al., 1974).

Um auch beim GTS II von Neurospora entsprechende Experimente zu ermöglichen, wurden von uns in Teil II der vorliegenden Arbeit, aufbauend auf die an ganzen Zellen erarbeiteten Befunde, Versuche zur Markierung und Isolierung von Komponenten des GTS II unternommen. Es wurde von uns angestrebt, die Komponenten des GTS II mittels differentieller Doppelmarkierung kenntlich zu machen während ihrer Neusynthese in aushungernden Zellen. Zur Erhöhung der Sensibilität solcher Versuche schien eine Voranreicherung der gesuchten Komponenten durch die Isolierung der Plasmamembran bzw. der durch osmotischen Schock in Lösung zu bringenden Membranproteine wünschenswert.

Als Plasmamembran-Leitenzym wurde bei der Membrananreicherung eine Oligomycin-resistente  $Mg^{2+}$ -ATPase getestet. Bei diesem Enzym handelt es sich möglicherweise um die postulierte Protonenpumpe, die am Aufbau des Membranpotentials beteiligt sein soll, welches seinerseits den zur Akkumulation der verschiedensten Substrate nötigen universellen Energie-pool darstellen soll. Die ermittelten Eigenschaften der von uns bei Neurospora untersuchten ATPase, wie z. B. ihre Membrangebundenheit,  $Mg^{2+}$ -Stimulierbarkeit, Oligomycinresistenz und ihr pH-Optimum stützen die An-

nahme, daß mit den durch dieses Enzym gekennzeichneten Membranvesikeln tatsächlich Plasmamembranen isoliert wurden. Nicht ganz in dieses Bild paßt jedoch die geringe Schwimmdichte dieser Vesikel (ca. 30 % Sucrose w/w entsprechend). Dies drückt sich auch darin aus, daß anders als bei Hefepräparationen, wo mitochondriale Vesikel bei ca. 40 % Sucrose über den Plasmamembranvesikeln (50 % Sucrose w/w) bandieren (Wehrli, E. et al., 1975; Matile, Ph. et al., 1967), in unserem Falle umgekehrt die durch die SDH-Aktivität charakterisierten mitochondrialen Vesikel bei 42 % Sucrose w/w unter den durch die ATPase gekennzeichneten Vesikeln bandierten. Bei den beiden bisher für *Neurospora* publizierten Zellmembranpräparationen ist nur bei einer Arbeit eine Schwimmdichteangabe zu finden (42 % - 50 % w/w Sucrose) (Wiley, W. R., 1974 a). Sie liegt jedoch auch deutlich über unserem Meßwert. Der Grund für diese unterschiedlichen Daten ist nicht klar. Vielleicht könnte er in den jeweils unterschiedlichen Präparationsmethoden oder dem jeweiligen Wachstumszustand der Zellen zu suchen sein, aus dem die Membranen präpariert wurden. Bei Hefe wurde für Plasmalemma, das aus aeroben Zellen präpariert wurde, eine deutlich niedrigere Dichte angegeben als für Plasmalemma, das aus anaeroben Zellen präpariert worden war. Bei aeroben Zellen gingen während des Trennungsganges sehr viel leichter die schweren Polysaccharid-synthetisierenden Partikel der Zellmembran verloren als bei anaeroben Zellen (Matile, Ph. et al., 1967).

Neben Zellmembran- und Mitochondrien-Membranen machen andere Membrantypen wie Vakuolen oder Endoplasmatisches Retikulum beim Wildtyp von *Neurospora* keinen großen Anteil aus. Im übrigen ist von keiner der genannten Membranen im Gegensatz zum Plasmalemma eine Oligomycin-resistente  $Mg^{2+}$ -ATPase als Leitenzym beschrieben worden (Hölzl-Wallach, D. F.; Knüfermann, H. G., 1973). Dies läßt mögliche alternative Deutungen für die ATPase-Vesikel weniger gesichert erscheinen als die genannte Annahme, daß es sich bei ihnen um Zellmembranfragmente handelt.

Die Messung von Glucose-Aufnahme oder auch nur einer Glucosebindung ist bisher bei keiner der zitierten, bei *Neurospora* in letzter Zeit isolierten, Zellmembranpräparationen gelungen. Mit den Methoden der Gleichgewichtsdialyse und der Ultrafiltration, mit denen eine Glucosebindeaktivität der Schockproteine zu mes-

sen war (Hack, A., 1974), ist der Nachweis einer Glucose-Bindung der ATPase-Membranen nicht zu erbringen gewesen. Dies mag daran gelegen haben, daß die spezifische Bindeaktivität der Membranen auf Grund des hohen Gehaltes anderer, nicht Glucose-bindender Membranproteine, hier nicht so hoch war wie in der Fraktion der Schockproteine, in die sehr selektiv nur periphere Membranproteine eingehen.

Auch der Versuch, Zellmembranvesikel durch Anlegen eines Protonengradienten in Anlehnung an das für ganze Neurosporzellen wahrscheinlich gemachte Glucose-Protonen-Symport-Modell zur Akkumulation von Glucose zu zwingen, erbrachte, ebenso wie die von anderen Autoren unternommenen entsprechenden Versuche mit Zellmembranvesikeln von Chlorella, keine positiven Befunde. Für den negativen Ausfall dieser Experimente wurde bei Chlorella ein interessanter Deutungsvorschlag vorgebracht und durch experimentelle Befunde wahrscheinlich gemacht. Demnach sollen die an die Vesikelpräparationen angelegten Protonengradienten durch die Entkoppler-ähnliche Wirkung freier Fettsäuren zusammenbrechen bevor noch ihre elektrochemische Energie zum Glucose-Protonen-Symport in das Vesikelinnere Anlaß gibt (Decker, M.; Tanner, W., 1975). Diese freien Fettsäuren sollen beim Zellaufschluß durch Phospholipasen aus Lipiden freigesetzt werden. Für Mitochondrien und Chloroplasten war die Entkoppler-Wirkung von freien Fettsäuren seit längerem bekannt (Galliard, T., 1974). Hinweise, die die obige Annahme stützen, stammen aus Versuchen, bei denen gezeigt wurde, daß eine Zugabe von rohem Zellaufschluß von Chlorella sowie von Chloroform/Methanolextrakten aus rohen Zellmembranen oder eine Zugabe von Linolsäure auch in vivo den Hexose-Transport ganzer Chlorellazellen fast vollständig hemmt. Dieser inhibitorische Effekt, der im Falle des GTS II auch durch eine Zugabe von Neurospora-Zellaufschluß zu ganzen Zellen zu reproduzieren ist, konnte durch hohe Konzentrationen Serumalbumin aufgehoben werden. Bei künftigen Versuchen, eine von Protonengradienten getriebene Glucoseakkumulation in den präparierten Membranvesikeln von Neurospora nachzuweisen, sollte darum zuerst eine Hemmung der Zell-eigenen Lipasen angestrebt werden. Daneben sollte auch versucht werden, die Anwesenheit von Glucosecarriern in den Zellmembranvesikeln durch die für Hefe publizierte Technik nachzuweisen. Hier war es kürzlich immerhin gelungen, min-

destens den passiven Glucose-influx bzw. efflux aus vorbeladenen Vesikeln in einen Carrier-vermittelten, durch Uranyl-Ionen hemmbaren Anteil und einen nicht-hemmbaren, durch Diffusion und Vesikelzerfall bedingten Anteil aufzutrennen (Wehrli, E. et al, 1975).

Von uns wie von anderen Autoren (Scarborough, G., 1975) wurde versucht, unter Ausnutzung des speziellen Regulationsmusters des GTS II, das durch die rasche Neusynthese einer Geschwindigkeits-bestimmenden Komponente nach Entzug von Glucose aus dem Anzuchtmedium gekennzeichnet ist, mit Hilfe der differentiellen Doppelmarkierung diese Komponente kenntlich zu machen. In entsprechenden Experimenten wurde von uns bei *Neurospora crassa* differentiell doppelmarkierte Zell-Membranvesikel und osmotische Schockproteine präpariert. Nach Auftrennung der Membranproteine wurde nach Komponenten gesucht, die wie das GTS II in vivo sowohl durch Aushungerung als auch durch Glycerinfütterung in angekeimten *Neurospora*-Zellen dereprimiert und preferentiell mit radioaktiven Aminosäuren markiert werden. Wider Erwarten waren in Detergens-Extrakten aus Plasmamembranpräparationen keine durch Aushungerung dereprimierbaren Proteine nachweisbar, obwohl in die Plasmamembran integriert das dereprimierbare GTS II eigentlich zu suchen sein sollte. Auch von den entsprechenden Versuchen anderer Autoren sind bis heute keine positiven Resultate publiziert worden (Scarborough, G., 1976). In den löslichen Proteinen von *Neurospora crassa* dagegen finden sich mehrere durch Aushungerung dereprimierbare Proteine. Die dereprimierbare(n) Komponente(n) des GTS II von *Neurospora crassa* sind nun also entweder ebenso wie beim PTS von Bakterien von vornherein lösliche Faktoren oder sie sind während der Präparation der Plasmamembranen in Lösung gegangen.

Darüber hinaus kann erwogen werden, daß unter Umständen die Nachweisgenauigkeit der Versuche bei den hier gewählten experimentellen Bedingungen zu gering war, um eine Identifizierung der vielleicht nur in sehr geringer Anzahl in den Zellmembranvesikeln vorliegenden Komponenten des GTS II zu ermöglichen. Eine Abschätzung der pro Zelle neusynthetisierten Glucose-Carrier, wie sie beim Glucose-Transport-System menschlicher Erythrozyten durch spezifische Hemmstoffe möglich war (Stein, W. D., 1964), wäre auch im Falle des GTS II von *Neurospora* von großem Wert, konnte jedoch bisher nicht unternommen werden, da entsprechende Hemmstoffe

für das GTS II bis heute nicht gefunden wurden.

Die Zellfraktion der Schockproteine, die nach osmotischem Schock ganzer angekeimter Neurosporazellen zu isolieren ist, enthält relativ leicht in Lösung zu bringende Membranproteine. Durch Bindetests war, wie erwähnt, eine Bindefähigkeit dieser Fraktion für Glucose und verwandte Zucker mit derselben Zuckerspezifität wie das GTS II in vivo nachgewiesen worden. Dies ließ auf ein eventuelles Vorhandensein von Komponenten des GTS II unter den Schockproteinen schließen (Hack, A., 1974).

Im Radioaktivitätsmuster differentiell doppelmarkierter Schockproteine fanden sich nach Auftrennung in der SDS-Diskelektrophorese zwei, durch Glucose-Entzug in ganzen Zellen zu induzierende Proteine (Abb. 20). Das Protein mit dem kleineren Molekulargewicht war im Gegensatz zu dem Protein mit dem höheren Molekulargewicht ebenso wie das GTS II sowohl durch Glucose-Entzug als auch durch Glycerin-Fütterung in angekeimten Neurosporazellen zu dereprimieren (Abb. 21). Dieser Befund kann als Hinweis gewertet werden, daß das Schockprotein mit dem kleineren Molekulargewicht eine Komponente des GTS II darstellen könnte. Diese Annahme stützt sich jedoch bisher nur auf die Tatsache, daß das dereprimierbare Schockprotein unter den gleichen Bedingungen zur Neusynthese gebracht werden konnte wie das GTS II in vivo. Eine weitere Klärung der Funktion des dereprimierbaren Schockproteines ist unerlässlich, da bei Neurospora eine ganze Reihe Glucose-reprimierbarer Proteine bekannt ist, die wie das GTS II nach einer Aushungerung der Zellen neusynthetisiert werden und deren gemeinsame Lokalisation in der Plasmamembran bzw. im periplasmatischen Raum wahrscheinlich ist. Es sind dies einmal die auch als Plasmamembranleitenzym beschriebene Invertase (Marzluf, G. A., 1973) und wie erwähnt das Lactose-, das Fructose- und das Galactose-Transport-System (Schneider, R. P.; Wiley, W. R., 1971 b). Die genannten Proteine und das GTS II werden also gleichermaßen durch eine Aushungerung zur Neusynthese angeregt. Darüber hinaus ist auch der zeitliche Ablauf ihrer Neusynthese gleich. Eine Klärung der Frage, welcher der fünf genannten oder weiteren Zellfunktion das durch Aushungerung sowie durch Glycerin-Supplementierung der Neurosporazelle

dereprimierbare Schockprotein zuzurechnen ist, sollte durch weiterführende Untersuchungen möglich sein.

Es sollte geprüft werden, ob die vier übrigen Glucose-reprimierbaren Funktionen wie das GTS II auch durch Glycerin dereprimierbar sind oder nicht, was gegebenenfalls als Unterscheidungskriterium herangezogen werden könnte.

Eine mögliche Beteiligung des durch Aushungerung und Glycerin-supplementierung der Zellen dereprimierbaren Schockproteines am Glucose-Transport von *Neurospora* müßte auch durch eine vergleichende Analyse mit GTS II-Defekt-Mutanten abgeklärt werden. In Auftrennungen differentiell doppelmarkierter Schockproteine geeigneter Mutanten sollte die fragliche Komponente nicht mehr bzw. mit verändertem Wanderungsverhalten im Gel auftauchen. Erfolgversprechend für Versuche dieser Art erschienen einige der Resistenzmutanten, die gegen den für *Neurospora crassa* toxischen Zucker Sorbose selektiert worden waren. Diese  $\text{sor}^r$ -Mutanten, die durch Kreuzungen und Komplementationstests sechs Genorten zugeordnet werden konnten (Klingmüller, W., 1967 b und c), weisen zum Teil einen gegenüber dem Wildtyp verringerten Sorbosetransport auf (Mutanten der Gene  $\text{sor}^r$  A,  $\text{sor}^r$  B und  $\text{sor}^r$  C). Bei einigen der Sorbose-resistenten Stämme, besonders bei den in verschiedenen Allelen des  $\text{sor}^r$  A-Genes veränderten Mutanten, war auch eine verringerte Glucose-Transportrate nachweisbar, weshalb es gerechtfertigt erschien, sie als GTS II-defekte Mutanten anzusehen. Eingehendere Untersuchungen der in der GTS II-Aktivität am stärksten verminderten A-Gen-Mutante zeigten jedoch, daß dieser Stamm nicht nur in seiner GTS II-Aktivität, sondern auch in der Aktivität von anderen Transportsystemen wie z. B. des Galactose-Transport-Systems betroffen ist. Dieser Befund läßt es nicht länger gerechtfertigt erscheinen, die im Glucose-Transport defekten  $\text{sor}^r$ -Mutanten als GTS II-spezifische Mutanten anzusehen. Vielmehr wäre denkbar, daß die pleiotropen Defekte dieser Stämme in unterschiedlichen Transportsystemen und in der Zellmorphologie auf eine Mutation der bei der Zellwand- und Zellmembransynthese beteiligten, Sorbose-hemmenden Enzyme Glucan- und Glycogen-Synthetase zurückzuführen sind (Tatum, E. L., 1973; Mishra, N. C.; Tatum, E. L., 1972).

Die  $\text{sor}^r$ -Mutanten können also nicht zur Klärung der Frage herangezogen werden, ob mit der Isolierung des durch Aushungerung dereprimierbaren Schockproteines tatsächlich die dereprimierbare Komponente des GTS II oder vielmehr ein anderes Glucose-reprimierbares Protein gefunden wurde. Hierzu wäre die Induktion und Untersuchung neuer, durch einen spezifischen Defekt im GTS II gekennzeichneten Mutanten nötig. Als Selektionstechnik zur Isolierung Transport-defekter Mutanten bietet sich die kürzlich publizierte "suicide"-Methode an, bei der nach Mutagenese die Wildtypzellen durch Anhäufung von radioaktivem Substrat auf Grund der Strahlungs-bedingten Schädigung während einer längeren Nachbehandlungszeit inaktiviert werden, spontane oder induzierte Mutanten mit verringerter Aufnahme des entsprechenden Substrates jedoch überleben (Lengeler, I., 1975). In Fällen, in denen das aktive Zentrum des Transport-Systems bekannt ist - eine SH-Gruppe im Beispiel des  $\beta$ -Galactosid-Permease von E.coli - konnte mit reversibel bindenden Inhibitoren des Transportsystems, mit milden SH-Reagentien, eine selektive Markierung des Transportsystems erreicht werden (Fox, C. F.; Kennedy, E. P., 1965). Die bisher unternommenen Versuche, für den Glucose-Transport von Neurospora ähnlich günstige Hemmstoffe zu finden, waren bisher nicht erfolgreich (Klingmüller, W. pers. Mitteilung). Es sollte jedoch möglich sein, unter Einbeziehung weiterer Verbindungen in die Prüfung einen GTS II-Hemmstoff zu finden, mit dessen Hilfe eine Markierung und Isolierung von Komponenten des GTS II ermöglicht wird. In menschlichen Erythrozyten gelang es z. B. mit Dinitrofluorobenzen (DNFB) den Glucose-Transport zu hemmen. Mit radioaktiv markiertem DNFB konnte darüber hinaus ein Peptid markiert werden, dessen Beteiligung am Glucose-Transport diskutiert wird (Stein, W. D., 1964).

Ein Vergleich der durch differentielle Doppelmarkierung während der GTS II-Derepression preferentiell markierten Proteine mit etwaigen durch geeignete Hemmstoff-Markierungsexperimente gekennzeichneten Proteinen könnte unter Umständen die bisher nur sehr vorläufige Annahme erhärten, daß das durch Aushungerung dereprimierbare Schockprotein mit dem kleiner Molekulargewicht eine Komponente des GTS II von Neurospora darstellt.

## E. Zusammenfassung

Die Permeation der wichtigen Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose durch die Zellmembran wird bei *Neurospora crassa* von zwei aktiven Glucose-Transport-Systemen, dem niederaffinen GTS I und dem hochaffinen GTS II ermöglicht. Im Teil I der vorliegenden Arbeit wird die Aktivität des GTS II in vivo mit dem Ziel untersucht, Einsicht in den Mechanismus seiner Regulation und seiner Energieversorgung zu gewinnen. Nachstehende Resultate und daraus ableitbare Folgerungen lassen sich zusammenfassen:

1. Es wurde eine CHX-sensible Erhöhung der  $V_{\max}$  des GTS II nach Aushungerung angekeimter Zellen festgestellt. Daraus kann auf eine Derepression von Komponenten des Systems geschlossen werden.
2. Diese dereprimierbaren Komponenten vermögen den influx und efflux sowie den Gegentransport von Glucose zu katalysieren. Sie fungieren also als mobile Carrier und nicht etwa als Protein einer Membran-Pore.
3. Die Zugabe von c-AMP verhindert unter derprimierenden Bedingungen die Neusynthese des GTS II. Der in vivo wirk-same Effektor bei der Derepression des GTS II kann also nicht c-AMP sein.
4. Nur bei im GTS II dereprimierten, nicht jedoch bei re-primierten Zellen, läßt sich eine deutliche Alkalinisierung des Außenmediums nach Zugabe von 3-O-mglc messen. Dies stützt die Annahme, daß das GTS II ein Glucose-Protonen-Symport-System darstellt.

Im Teil II der vorliegenden Arbeit werden Versuche zur Isolierung der dereprimierbaren Komponente des GTS II aus der Plasmamembran und aus osmotischen Schockproteinen beschrieben. Sie führten zu den folgenden Resultaten und Schlüssen:

5. Es wurden Zellmembranvesikel von *Neurospora* präpariert, die durch eine hohe Aktivität der Oligomycin-resistenten  $Mg^{2+}$ -ATPase und eine geringe Kontamination mitochondrialer Leitenzyme gekennzeichnet waren.
6. Diese Vesikel besitzen im Gegensatz zu den durch osmotischen Schock ganzer Zellen in Lösung zu bringenden Schockproteine keine Glucose-Bindeaktivität.
7. Durch Doppelmarkierungsversuche ließ sich unter Ausnutzung des speziellen Regulationsmusters des GTS II wider Erwarten nur in der Fraktion der Schockproteine, nicht jedoch in der Fraktion der Zellmembranvesikel eine Komponente nachweisen, die wie das GTS II sowohl nach Glucose-Entzug, als auch nach Glycerin-Zugabe in angekeimten Zellen dereprimiert wird. Unter Umständen könnte jedoch dieses dereprimierbare Schockprotein eine Komponente des GTS II darstellen.
8. Die Sorbose-resistenten Mutanten ( $sor^r$ ) erwiesen sich nicht spezifisch nur im Glucose-Transport sondern pleiotrop auch im Galactose-Transport defekt. Die Frage, ob das durch die gleichen Bedingungen wie das GTS II dereprimierbare Schockprotein am Glucose-Transport von *Neurospora* beteiligt ist, läßt sich durch diese Mutanten also nicht klären.

Literaturverzeichnis

Arst, H. N.; MacDonald, D. W. (1975):

A Gene Cluster in *Aspergillus nidulans* with an Internally Located Cis-Acting Regulatory Region.

Nature 254 p. 26

Bamberg, E.; Benz, R.; Luger, P.; Stark, G. (1974):

Ionentransport durch biologische Membranen.

Chemie in unserer Zeit, 8 Jg. Nr. 2, p. 33

Barnes, E. M. jr.; Kaback, H. R. (1970):

$\beta$ -Galactosidetransport in Bacterial Membrane Preparations: Energy Coupling via Membrane-Bound D-Lactic Dehydrogenase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 p. 1190

Baron, C.; Abrams, A. (1971):

Isolation of a Bacterial Membrane Protein, Nectin, Essential for the Attachment of Adenosine Triphosphatase.

J. Biol. Chem. 246 p. 1542

Beadle, G. W.; Tatum, E. L. (1941):

Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 27 p. 449

Christensen, M. S.; Cirillo, V. P. (1972):

Yeast Membrane Vesicles: Isolation and General Characteristics.

J. Bacteriol. 110 p. 1190

Decker, M.; Tanner, W. (1975):

Rapid Release of Free Fatty Acids During Cell Breakage and Their Effects on a Sugar-Proton Cotransport System in *Chlorella vulgaris*.

FEBS Letters 60 p. 346

Delhez, J.; Goffeau, A. (1975):

Inhibitor Sensitivities of Mitochondrial and Non-Mitochondrial Membrane-Bound ATPases in Yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Abstracts Bari Symposia 1975, p. 51

Doxiadis, I. (1976):

Zuckertransport bei *Neurospora crassa*: Versuche zur Regulation des hochaffinen Glucose-Transport-Systems II.

Diplomarbeit, Biologischer Fachbereich der LMU München

Fang, M.; Butow, R. A. (1970):

Nucleotide Reversal of Mitochondrial Repression in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. Biophys. Research Commun. 41 p. 1579

Fels, E. M. (1967):

Statistische Methodenlehre; p. 167

Skriptenreihe des ASTA der Universität München

Ferguson jr., J. J.; Boll, M.; Holzer, H. (1967):

Yeast Malate Dehydrogenase: Enzyme Inactivation in Catabolite Repression.

Europ. J. Biochem. 1 p. 21

Fiske, C. H.; Subarrow, Y. (1925):

The Colorimetric Determination of Phosphorus.

J. Biol. Chem. 66 p. 375

Flawiá, M. M.; Torres, H. N. (1972):

Adenylate Cyclase Activity in *Neurospora crassa*.

J. Biol. Chem. 247 p. 6873

Foury, F.; Goffeau, A. (1975):

Stimulation of Active Uptake of Nucleosides and Amino Acids by Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate in the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

J. Biol. Chem. 250 Nr. 6 p. 2354

Fox, C. F.; Kennedy, E. P. (1965):

Specific Labeling and Partial Purification of the M Protein, a Component of the  $\beta$ -Galactoside Transportsystem of *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 p. 891

Fuhrmann, G. F.; Wehrli, E.; Boehm, C. (1974):  
Preparation and Identification of Yeast Plasma Membrane  
Vesicles.

Biochim. Biophys. Acta 363 p. 295

Galliard, T. (1974):

Techniques for Overcoming Problems of Lipolytic Enzymes and  
Lipoxygenases in the Preparation of Plant Organelles.

Methods in Enzymology, Vol. XXXI, A; p. 520

Academic Press, New York

Glossmann, H.; Lutz, F. (1970):

Molecular Weights of Pig Liver Cell Membrane Proteins

Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. Bd. 351 p. 1583

Grosch, G. (1976):

Wirkung von Rifampicin auf die Transkription von Neurospora-  
Zellen in vivo.

Diplomarbeit Biologischer Fachbereich der LMU München

Hack, A. (1974):

Versuche zur Isolierung zuckerbindender Proteine von  
Neurospora crassa durch osmotischen Schock.

Dissertation, Fakultät für Biologie der LMU München

Halaban, R. (1975):

Glucose Transport-Deficient Mutant of Neurospora crassa  
with an Unusual Rhythmic Growth Pattern.

J. Bacteriol. 121 p. 1056

Hallermayer, G.; Neupert, W. (1974):

Lipid Composition of Mitochondrial Outer and Inner  
Membranes of Neurospora crassa.

Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. Bd. 355 p. 279

Harold, F. M. (1974):

Chemiosmotic Interpretation of Active Transport in Bacteria.  
in: "The Mechanism of Energy Transduction in Biological Systems".  
Annals of the New York Academy of Sciences 227 p. 297

Hartmann, G. R. (1975):

Symposium "Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemo-  
therapy".

Edited by Drews e. a. Springer Verlag, Wien

Heidrick, M. L.; Ryan, W. L. (1971):

Metabolism of 3', 5'-Cyclic AMP by Strains L Cells.  
Biochim. Biophys. Acta 237 p. 301

Heldt, H. W.; Sauer, F. (1971):

The Inner Membrane of the Chloroplast Envelope as the Site  
of Specific Metabolite Transport.

Biochim. Biophys. Acta 234 p. 83

Hoelzl Wallach, D. F.; Knüfermann, H. G. (1973):

In: "Plasmamembranen"

Heidelberger Taschenbücher; Springer-Verlag, Berlin

Horák, J.; Kotyk, A. (1973):

Isolation of a Glucose-Binding Lipoprotein from Yeast Plasma  
Membrane.

Europ. J. Biochem. 32 p. 36

Kaback, H. R. (1970 a):

Transport.

Annular Review of Biochemistry 39 p. 561

Kaback, H. R. (1970 b):

The Transport of Sugars Across Isolated Bacterial Membranes.

In: "Current Topics im Membranes and Transport". Vol. 1 p. 35  
Academic Press, New York

Kaback, H. R. (1972):

Transport Across Isolated Bacterial Cytoplasmic Membranes.

Biochim. Biophys. Acta 265 p. 367

Kaukel, E.; Mundhenk, K.; Hilz, H. (1972):

N<sup>6</sup>-Monobutyryladenose 3':5'-Monophosphat als das Biologisch  
Aktive Derivat von Dibutyryladenose 3':5'-Monophosphat  
in HeLa S 3 Zellen.

Europ. J. Biochem. 27 p. 197

Kennedy, E. P. (1970):

The Lactose Permease System of *Escherichia coli*.

In: "The Lactose Operon". p. 49

Beckwith, J. R. et al eds.

Cold Spring Harbor Laboratory

Klingenberg, M.; Riccio, P.; Aquila, H.; Schmiedt, B.; Grebe, K.;  
Tropitsch, P. (1974):

Charakterisierung der ADP/ATP Carrier in Mitochondrien.

in: "Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation". p. 229

Azzone G. F. et al. eds.

North-Holland American Elsevier

Klingmüller, W.; Kaudewitz, F. (1966):

Permease Mutanten in *Neurospora crassa* und ihre Komplementation  
Charakteristika.

Proceedings of the Symposium on the Mutational Process.

Prag, August 1966, p. 309

Klingmüller, W. (1967 a):

Aktive Aufnahme von Zuckern durch Zellen von *Neurospora crassa*  
unter Beteiligung eines enzymatischen Systems mit Permease-  
eigenschaften I.

Z. Naturforschg. 22 b p. 181

Klingmüller, W. (1967 b):

Kreuzungs-Analyse Sorbose-resistenter Mutanten von *Neurospora*  
*crassa*.

Molec. Gen. Genetics 100 p. 109

Klingmüller, W. (1967 c):

Analyse der Sorbose-Resistenz von *Neurospora crassa* an  
Heterokaryen sorboseresistenter Mutanten;

ein Beitrag zur Genetik des aktiven Transports, I.

Molec. Gen. Genetics 100 p. 27

Klingmüller, W.; Huh, H. (1972):

Sugar Transport in *Neurospora* Conidia: Influence of pH and Starvation.

Arch. Microbiol. 81 p. 239

Kolber, A. R.; Stein, W. D. (1967):

The Isolation of a Membrane Bound Protein Associated with the  $\beta$ -Galactoside Permease of *Escherichia coli*.

Curr. Mol. Biol. 1 p. 244

Künzel, H.; Schäfer, K. P.; (1971):

Mitochondrial RNA Polymerase from *Neurospora crassa*.

Nature New Biol. 231 p. 265

Komor, E.; Haass, D.; Tanner, W. (1972):

Unusual Features of the Active Hexose Uptake System of *Chlorella vulgaris*.

Biochim. Biophys. Acta 266 p. 649

Komor, E. (1973):

Proton-Coupled Hexose Transport in *Chlorella vulgaris*.

FEBS Letters 38 p. 16

Komor, E.; Loos, E.; Tanner, W. (1973):

A Confirmation of the Proposed Model for the Hexose Uptake System of *Chlorella vulgaris*.

Anaerobic Studies in the Light and in the Dark.

J. Membrane Biol. 12 p. 89

Komor, E.; Tanner, W. (1974):

The Hexose-Proton Cotransport System of *Chlorella*

J. Gen. Physiol. 64 p. 568

Kotyck, A.; Janacek, K. (1970):

Cell Membrane Transport.

Plenum Press New York p. 61

Kundig, W.; Ghosh, S.; Roseman, S. (1964):

Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52 p. 1067

Kundig, W.; Roseman, S. (1971):

Sugar Transport.

J. Biol. Chem. 246 p. 1407

Lengeler, J. (1975):

Mutations Affecting Transport of Hexitols D-Mannitol, D-Glucitol, and Galacitol in E.coli K12: Isolation and Mapping.

J. Bacteriol. 124 p. 26

Lombardi, F. J.; Kaback, H. R. (1974):

Evaluation of Chemiosmotic Interpretation of Active Transport in Bacterial Membrane Vesicles.

in: " The Mechanism of Energy Transduction in Biological Systems".  
Annals of the New York Academy of Sciences 227 p. 312

Longley, R. P.; Rose, A. H.; Knights, B. A. (1968):

Composition of the Protoplast Membrane from *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. J. 108 p. 401

Lowendorf, H. S.; Slayman, C. L.; Slayman, C. W. (1974):

Phosphate Transport in *Neurospora*: Kinetic Characterization of a Constitutive, Low-Affinity Transport System.

Biochim. Biophys. Acta 373 p. 369

Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J. (1951):

Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193 p. 265

Makman, R. S.; Sutherland, E. W. (1965):

Adenosine 3', 5'-Phosphate in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. 240 1309

Marzluf, G. A. (1973):

Regeneration of Invertase in *Neurospora crassa*.

J. Bacteriol. 115 p. 146

Matile, Ph.; Moor, H.; Mühlethaler, K. (1967):

Isolation and Properties of the Plasmalemma in Yeast.

Archiv f. Mikrobiologie 58 p. 201

Matile, Ph. (1970):

Properties of the Purified Cytoplasmic Membrane of Yeast.

FEBS Symposium 20 p. 39

Michal, G.; Woschee, M.; Wunderland, P. (1971):

Cyclophosphate IV: Penetration Studies with A-3':A5'-MP in the Rat Liver.

Life Sciences 10, II p. 841

Miller, J. H. (1972):

c-AMP, Catabolite Repression and Cell-Free Enzyme Synthesis.

in: "Experiments in Molecular Genetics" p.412

Cold-Spring Harbor Laboratory

Mishra, N. C.; Tatum, E. L. (1972):

Effect of L-Sorbose on Polysaccharide Synthetases in *Neurospora crassa*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 p. 313

Mitchell, P. (1967):

Active Transport and Ion Accumulation.

Comprehensiv Biochemistry 22 p. 167

Narayanan, K.; Doxiadis, J.; Brass, J. M. (1976):

Regulation of Sugar Transport in *Neurospora crassa*.

In Vorbereitung.

Neu, H. C.; Heppel, L. A. (1965):

The Release of Enzymes from *Escherichia coli* by Osmotic Shock and During the Formation of Spheroplasts.

J. Biol. Chem. 240 p. 3685

Nurminen, T.; Oura, E.; Suomalainen, H. (1970):

The Enzymic Composition of the Isolated Cell Wall and Plasma Membrane of Baker's Yeast.

Biochem. J. 116 p. 61

Ono, B. I. (1972):

Plasmamembrane Protein from the sl-Mutant of *Neurospora crassa*.

Thesis University Minnesota

Peterkofsky, A.; Gazdar, C. (1974):

Glucose Inhibition of Adenylate Cyclase in Intact Cells of *Escherichia coli* B.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 Nr. 6 p. 2324

Racker, E. (1970):

Membranes of Mitochondria and Chloroplasts.

ACS Monograph 165 p. 213

Roseman, S. (1969):

The Transport of Carbohydrates by a Bacterial Phosphotransferase Reaction.

J. Gen. Physiol. 54 p. 1388

Scarborough, G. A. (1970 a):

Sugar Transport in *Neurospora crassa*.

J. Biol. Chem. 245 p. 1694

Scarborough, G. A. (1970 b):

Sugar Transport in *Neurospora crassa*.

J. Biol. Chem. 245 p. 3985

Scarborough, G. A. (1971):

Sugar Transport in *Neurospora crassa*.

Biochem. Biophys. Research Commun. 43 p. 968

Scarborough, G. A. (1975):

Isolation and Characterization of *Neurospora crassa* Plasma Membranes.

J. Biol. Chem. 250 p. 1106

Scarborough, G. A. (1976):

The Neurospora Plasma Membrane ATPase is an Electrogenic Pump  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 p. 1485

Schneider, R. P.; Wiley, W. R. (1971 a):

Kinetic Characteristics of the Two Glucose Transport Systems  
in Neurospora crassa.

J. Bacteriol. 106 p. 479

Schneider, R. P.; Wiley, W. R. (1971 b):

Regulation of Sugar Transport in Neurospora crassa.

J. Bacteriol. 106 p. 487

Schneider, R. P.; Wiley, W. R. (1971 c):

Transcription and Degradation of Messenger Ribonucleic Acid  
for a Glucose Transport System in Neurospora.

J. Biol. Chem. 246 p. 4784

Slayman, C. L.; Long, W. S.; Lu, C. Y.-H. (1973):

The Relationship between ATP and an Electrogenic Pump in the  
Plasma Membrane of Neurospora crassa.

J. Membrane Biology 14 p. 305

Slayman, C. L.; Slayman, C. W. (1974):

Depolarization of the Plasma Membrane of Neurospora During  
Active Transport of Glucose: Evidence for a Proton-Dependent  
Cotransport System.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 p. 1935

Slayman, C. W. (1974):

Seventh Neurospora Information Conference Asilomar:  
Session A: Membranes and Transport.

Neurospora Newsletters 21 p. 7

Stein, W. D. (1964):

In: "The Structure and Activity of Enzymes" p. 133

Goodwin, T. W. et al. ed.

Academic Press, New York

v. Steveninck, J. (1968):

Transport and Transport-Associated Phosphorylation of 2-Deoxy-D-Glucose in Yeast.

Biochim. Biophys. Acta 163 p. 386

Tatum, E. L. (1973):

Biochemische Genetik der Morphogenese bei Neurospora.

Naturw. Rdsch. 26 Jahrg. p. 140

Téllez-Inón, M. T.,; Torres, H. N. (1970):

Interconvertible Forms of Glycogen Phosphorylase in Neurospora crassa.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 p. 459

Timberlake, W. E.; Turian, G. (1974):

Multiple DNA-Dependant RNA-Polymerases of Neurospora crassa.

Experienta 30 p. 1236

Tisdale, H. D. (1967):

Preparation and Properties of Succinic-Cytochrome c Reductase (Complex II - III)

In: "Methods in Enzymology" Vol. X p. 213

Estabrook, R. W. et al. eds. Academic Press, New York

Tomkins, G. M.; Gelehrter, T. D.,; Grauner, D., Martin jr., D.;

Samuels, H. H.; Thompson, E. B. (1969):

Control of Specific Gene Expression in Higher Organisms.

Science 166 p. 1474

Träger, L. (1969):

"Einführung in die Molekularbiologie" p.130

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Vogel, H. J. (1956):

A Convenient Growth Medium for *Neurospora*.

Microbial Genet. Bull. 13 p. 42

Wehrli, W.; Staehelin, M. (1975):

Rifampicins and Other Ansamycins.

in: "Antibiotics III: Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents". p. 252

Wehrli, E.; Boehm, C.; Fuhrmann, G. F. (1975):

Yeast Plasma Membrane Vesicles Suitable for Transport Studies

J. Bacteriol. 124 p. 1594

West, O. C.; Mitchell, P. (1973):

Stoichiometry of Lactose-Proton-Symport Across the Plasma Membrane of *Escherichia coli*.

Biochem. J. 132 p. 587

v. Wijk, R. (1971):

Cyclic 3', 5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under Various Conditions of Catabolite Repression.

FEBS Letters 13 p. 184

Wiley, W. R. (1970):

Tryptophan Transport in *Neurospora crassa*: A Tryptophan-Binding Protein Released by Cold Osmotic Shock.

J. Bacteriol. 103 p. 656

Wiley, W. R. (1974 a):

Isolation of Spheroplast and Membrane Vesicles from Yeast and Filamentous Fungi.

Methods in Enzymology Vol. XXXI A, p. 609

Academic Press, New York

Wiley, W. R. (1974 b):

Membranes and Transport:

Report on the Seventh *Neurospora* Information Conference.

*Neurospora* Newsletters 21 p. 5

Zubay, G.; Schwartz, D.; Beckwith, J. (1970):

Mechanism of Activation of Catabolite-Sensitive Genes:

A Positive Control System.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 p. 104



Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. W. Klingmüller für die Anregung zu diesen Untersuchungen und die Beratung während der Experimente herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner:

Herrn Professor Dr. F. Kaudewitz für die Möglichkeit, diese Arbeit am Genetischen Institut der Universität München durchzuführen,

Fräulein H. Gagger und Fräulein D. Sell für die gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung eines Teils der Versuche und für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen, sowie Frau A. Saas für die Herstellung der elektronenoptischen Abbildungen .



## Lebenslauf

- 1944                    Geboren in Hermannseifen (Böhmen) am 24. November
- 1950 bis 1955        Volksschule in Lindau (Bodensee)
- 1955 bis 1964        Humanistisches Gymnasium, Abitur in Lindau
- 1964 bis 1967        Studium der Biologie an der Universität Bonn
- 1967 bis 1969        Studium der Biologie an der Universität München
- 1969 bis 1970        Diplomarbeit bei Professor W. Klingmüller  
                         Studienabschluß mit Diplom in Biologie
- 1970                   Eheschließung mit Dr. med. Barbara Lüth
- 1970                   Einweisung auf eine Stelle als wissenschaftlicher  
                         Angestellter am Genetischen Institut der  
                         Universität München
- 1971                   Beginn der Dissertationsarbeit bei  
                         Professor W. Klingmüller
- 1971                   Geburt unseres Sohnes Michael









